



Développement d'un dispositif microfluidique ayant pour objectif l'étude des effets de premiers passages intestinaux et hépatiques

Thibault Bricks

► To cite this version:

Thibault Bricks. Développement d'un dispositif microfluidique ayant pour objectif l'étude des effets de premiers passages intestinaux et hépatiques. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2014. Français. NNT : 2014COMP2151 . tel-01235621

HAL Id: tel-01235621

<https://theses.hal.science/tel-01235621>

Submitted on 30 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par **Thibault BRICKS**

Développement d'un dispositif microfluidique ayant pour objectif l'étude des effets de premiers passages intestinaux et hépatiques

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 17 novembre 2014

Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2151

UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

ECOLE DOCTORALE

BIO INGENIERIE, BIOMECHANIQUE, BIOMATERIAUX

Développement d'un dispositif microfluidique ayant pour
objectif l'étude des effets de premiers passages
intestinaux et hépatiques

BRICKS Thibault

Directeur de thèse : LECLERC Eric

[Soutenance le 17 novembre 2014]

Membres du jury :

Mme M. DAUJAT-CHAVANIEU (Rapporteur)

M. C. EGLES (Examineur)

M. H. FICHEUX (Examineur)

M. E. LECLERC (Examineur)

Mme C. LEGALLAIS (Examineur)

M. JM. LO GUIDICE (Rapporteur)

RESUME

Le développement de méthodes *in vitro* fiables et prédictives représente à l'heure actuelle un véritable défi. En effet, la demande en méthodes alternatives à l'expérimentation animale n'a cessé de croître ces dernières années du fait de la mise en place de législations limitant par considérations éthiques l'utilisation de ces modèles *in vivo*. De plus, ce besoin a été renforcé par le règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) imposant aux industriels de valider l'innocuité de nombreuses substances déjà commercialisées. Toutefois, les modèles *in vitro* classiques consistant en la culture simple de cellules en monocouche dans des boîtes de Petri ne permettent pas de conserver les propriétés initiales de ces cellules et de retranscrire les conditions et l'environnement cellulaire des organes *in vivo*. Le développement de méthodes alternatives *in vitro* prédictives s'avèrent donc crucial en particulier pour mimer le fonctionnement de deux organes : l'intestin et le foie. En effet, ces deux organes sont largement impliqués dans les processus d'Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME) de la plupart des xénobiotiques ingérés.

C'est pour ces raisons que nous avons testé la faisabilité de l'une de ces méthodes *in vitro* alternative permettant d'associer une barrière intestinale à la culture dynamique de cellules hépatiques au sein de microsystèmes dans le cadre de ce doctorat. Cette coculture est effectuée au sein du dispositif appelé IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform). Nous avons décidé de tester d'une part l'influence de la culture dynamique et d'autre part d'éventuelles interactions entre les cellules intestinales et hépatiques sur la fonctionnalité et l'activité métabolique de ces deux types cellulaires.

Les résultats obtenus durant ce doctorat ont permis d'atteindre 4 objectifs :

- Développer un dispositif fiable en termes de fonctionnalité (fluidique, robustesse...).
- Mettre en évidence l'innocuité du dispositif lorsque des cellules de lignée et primaires y étaient cultivées.
- Démontrer les avantages de l'utilisation de ce dispositif comparativement à l'utilisation de modèles classiques *in vitro*, en particulier avec des cellules de lignée.
- Démontrer que l'utilisation de ce dispositif permettait de mettre en évidence des phénomènes d'interactions entre cellules intestinales et hépatiques notamment sur l'activité du CYP1A2 des hépatocytes qu'ils soient issus d'une lignée ou de cultures primaires.

Mots clés : Coculture, intestin, foie, effets de premiers passages, microfluidique, microsystèmes, IIDMP, IDCCM, Caco-2 TC7, HepG2 C3A, hépatocytes primaires humains, phénacétine, oméprazole, clairances.

SUMMARY

The development of reliable and predictive *in vitro* methods is a real challenge. Indeed, the demand for alternative methods to animal experimentation has been growing in recent years due to the introduction of legislation limiting the use of these models *in vivo* by ethical considerations. Moreover, this need was amplified by regulations such as the European REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) requiring the safety validation of many substances.

However, the conventional *in vitro* model consisting in a simple cell culture monolayer in Petri dishes does not preserve the initial properties of these cells and does not mimic the conditions of the cellular environment and organs *in vivo*. The development of alternative *in vitro* predictive methods is crucial especially to mimic the working of two organs: the intestine and liver. Indeed, these two organs are involved in the process of Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) of most xenobiotics ingested.

We propose in this thesis to test the feasibility of one of these *in vitro* alternative methods allowing the association between an intestinal barrier and the dynamic culture of hepatic cells in microsystems in a device called IIDMP (Integrated Dynamic Insert in a Microfluidic Platform). We tested the influence of the flow of culture and possible interactions between intestinal and liver cells on the function and metabolic activity of these two cell types.

Then, we demonstrated that:

- This device is reliable in terms of global functionality (fluid, robustness ...).
- This device did not injury the integrity of the cell line and primary cells.
- The use of this device has many advantages when compared with the use of conventional *in vitro* models, especially with cells line.
- The use of this device highlights phenomena of interaction between hepatic and intestinal cells as an increase of the CYP1A2 activity of HepG2 C3A and human primary hepatocytes.

Keywords : *Coculture, intestine, liver, first pass metabolism, microfluidic, microsystems, IIDMP, IDCCM, Caco-2 TC7, HepG2 C3A, human primary hepatocytes, phenacetin, omeprazole, clearances.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à l'élaboration des expérimentations et des articles ayant permis l'écriture de ce manuscrit.

Ces remerciements vont à mon directeur de thèse : Eric Leclerc, qui m'a permis de prendre part à cette expérience enrichissante que constitue une thèse. La confiance et la liberté qu'il m'a accordé pour mener à bien ce doctorat m'ont permis de gagner en maturité et en autonomie et d'acquérir de nombreuses compétences théoriques et pratiques.

Je remercie Mme Martine Daujat-Chavanieu chargée de recherche INSERM et M. Jean Marc Lo Guidice chargé de recherche INSERM pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs et pour le temps qu'ils ont consacré à la correction de ce manuscrit. Je remercie également M. Christophe Egles, professeur à l'UTC, Mme Cécile Legallais, directeur de recherche au CNRS et à M. Hervé Ficheux, toxicologiste et manager en assurance qualité à Thor pour leur présence à ma soutenance de thèse en tant qu'examineurs.

Un grand merci à mes collègues qui m'ont soutenu même dans les moments difficiles en particulier Jeremy Hamon, mon partenaire sportif qui m'a permis de prendre du recul et de garder la ligne pendant ces 3 années, Ulysse Pereira pour son humour, sa disponibilité et bienveillance, Timothée Baudequin pour les longues conversations scientifiques (ou non) que nous avons menées et sans qui l'apprentissage du six qui prend aurait été impossible, Vittoria Pandolfi pour son entrain et l'exemple de persévérance qu'elle a su me montrer, Rachid Jellali pour notre virée à Rennes et son esprit pratique et enfin Guillaume Vidal pour son calme et sa capacité à relativiser même dans les pires moments des expérimentations. Merci aussi à tous ceux qui ont contribué à ma formation comme Audrey Legendre qui m'a montré le fonctionnement de dispositifs comme le CCDIM dont l'optimisation et l'utilisation a parfois été laborieuse.

Je veux aussi remercier Patrick Paullier pour son soutien et l'accueil qu'il m'a fait au sein de l'unité, chose précieuse lors d'un début de thèse. Mes remerciements les plus sincères vont aussi à Muriel Dufresnes pour sa gentillesse, son humilité, sa pédagogie et son oreille attentive. Merci à Cécile Legallais, sans qui certaines des formations que j'ai suivi parallèlement à ce doctorat n'aurait pas été possible. Les conseils avisés de Marie José Fleury, sa gentillesse et sa disponibilité même pour réaliser les expérimentations les plus complexes m'ont été précieux et je la remercie pour cela.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier celle sans qui rien de tout ça n'aurait été possible et qui constitue pour moi la source de mon bonheur. Elle se reconnaîtra sans aucun

doute à la lecture de ces lignes qui ne représentent pas suffisamment à mon goût tout l'amour que je lui porte. Je tiens également à remercier les membres de ma famille et mes amis qui représentent les fondations sur lesquelles repose mon envie de progresser et d'apprendre toujours plus.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Participation à des congrès

Eurotox, 2013, Interlaken, Suisse

Poster : Premier prix de la Société Européenne de Toxicologie *In Vitro*

Bricks, T., Paullier, P., Fleury, M.-J., Leclerc, E., 2013. Development of a new microfluidic device consisting in the coculture of intestinal and hepatic cells.

Publications scientifiques

Publiées :

Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P.M., Leclerc, E., 2014. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 885–895. doi:10.1016/j.tiv.2014.02.005

Legendre, A., Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Naudot, M., Bricks, T., Brocheton, J., Jacques, S., Cotton, J., Leclerc, E., 2013. Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. *J. Pharm. Sci.* 102, 3264–3276. doi:10.1002/jps.23466

Prot, J.M., Maciel, L., Bricks, T., Merlier, F., Cotton, J., Paullier, P., Bois, F.Y., Leclerc, E., 2014. First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol. Bioeng.* doi:10.1002/bit.25232

En rédaction

Bricks, T., Hamon, J., Fleury, M.J., Jellali, R., Merlier, F., Herpe, Y.E., Cotton, J., Bois, F., Leclerc, E., 2014b. Comparison of omeprazole and phenacetin hepatic clearances using human primary cryopreserved hepatocytes in petri and microfluidic cultures.

Bricks, T., Hamon, J., Fleury, M.J., Jellali, R., Merlier, F., Herpe, Y.E., Cotton, J., Bois, F., Leclerc, E., 2014. Comparison of omeprazole and phenacetin first pass metabolism using human primary cryopreserved hepatocytes and Caco-2 TC7 in microscale bioreactor.

Bricks, T., Zeller, P., Vidal, G., Jacques, S., Anton Gay, P., Leclerc, E., 2014. Multiparametric temporal analysis of Caco-2 TC7 demonstrated functional and differentiated monolayers since 14 days of culture.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UNITE DANS LAQUELLE LA THESE A ETE PREPAREE

UMR CNRS 7338

Laboratoire de Biomécanique – Bio-ingénierie

Centre de Recherche de Royallieu

Université de Technologie de Compiègne

60205 Compiègne

France

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	16
---------------------------------------	-----------

CHAPITRE 2 : BIBLIOGRAPHIE.....	20
--	-----------

I. PROCESSUS D'ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISME ET EXCRETION CONSECUTIFS AU CONTACT DE XENOBIOTIQUES AVEC L'ORGANISME	20
---	-----------

1. Absorption des xénobiotiques	21
2. Distribution des xénobiotiques	25
3. Métabolisme et excrétion des xénobiotiques.....	27
3.1. Métabolisme de phase I.....	27
3.2. Métabolisme de phase II et excrétion	30

II. CYCLE ENTERO HEPATIQUE ET EFFETS DE PREMIER PASSAGE	33
--	-----------

1. Propriétés et paramètres d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion de l'intestin grêle.....	33
1.1. Propriétés de l'intestin grêle.....	33
1.2. Absorption et excrétion intestinale	35
1.3. Métabolisme intestinal	37
2. Propriétés du foie et paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion hépatiques.....	39
2.1. Propriétés du foie	39
2.2. Absorption, métabolisme et excrétion hépatique.....	43

III. DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE À L'UTILISATION DES METHODES <i>IN VITRO</i> ALTERNATIVES : CONTEXTE ETHIQUE, REGLEMENTAIRE ET SCIENTIFIQUE.	46
--	-----------

1. Cadre réglementaire et éthique de l'expérimentation animale	46
2. Contexte scientifique et opportunité économique au développement des méthodes alternatives	48
2.1. Importance des modèles <i>in vitro</i> dans le développement pharmaceutique	49
2.2. Limites du modèle <i>in vivo</i>	50

IV. DESCRIPTION DES METHODES ALTERNATIVES CLASSIQUES	52
---	-----------

1. Méthodes <i>ex vivo</i>	52
----------------------------------	----

1.1.	Modèles <i>ex vivo</i> intestinaux.....	53
1.2.	Modèles <i>ex vivo</i> hépatiques.....	54
2.	Méthodes <i>in vitro</i> cellulaires.....	55
2.1.	Modèles <i>in vitro</i> cellulaires intestinaux	56
2.2.	Modèles <i>in vitro</i> cellulaires hépatiques	60
2.3.	Méthodes <i>in silico</i>	62
V.	NOUVELLES METHODES ALTERNATIVES.....	65
1.	Méthodes <i>in vitro</i> intestinales	66
1.1.	Cultures en boîtes de Pétri.....	66
1.2.	Microsystèmes	67
2.	Méthodes <i>in vitro</i> hépatiques	69
2.1.	Sphéroïdes et billes	69
2.2.	Culture en sandwich	71
2.3.	Microsystèmes	72
3.	Modèles <i>in vitro</i> de coculture intestin/foie	75
3.1.	Coculture statique.....	75
3.2.	Coculture dynamique.....	76
VI.	CONCLUSION ET OBJECTIFS DU DOCTORAT	79
 <u>CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES.....</u>		81
I.	FABRICATION DES MICROSYSTEMES.....	81
II.	CULTURE CELLULAIRE	84
1.	Culture des lignées cellulaires et composition des milieux de culture	84
2.	Culture des hépatocytes primaires humains et composition des milieux de culture ..	85
III.	DISPOSITIF DE COCULTURE.....	86
1.	Conception	86
2.	Déroulement des expérimentations	88
IV.	PRÉPARATION DES TEMOINS.....	91
1.	Coculture statique des TC7 et des HepG2 C3A	91
2.	IDCCM.....	91
3.	Culture des Caco-2 TC7 en inserts et des hépatocytes primaires en Pétri	92

V. TESTS DE L'INTEGRITE ET DE LA FONCTIONNALITE DE LA BARRIERE INTESTINALE ET DES CELLULES HÉPATIQUES.....	94
1. Jaune Lucifer.....	94
2. Résistance électrique transépithéliale (TEER).....	94
3. Marqueurs des jonctions serrées.....	95
4. Activité de la P-glycoprotéine	96
5. Viabilité et activité des cellules hépatiques	96
VI. ACTIVITÉ DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES DES CELLULES INTESTINALES ET HEPATIQUES.....	98
1. Activités d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phase I.....	98
1.1. EROD	98
1.2. Phénacétine et oméprazole	98
1.3. Mesure de l'adsorption.....	99
2. Calcul des clairances intrinsèques de l'oméprazole et de la phénacétine	100
2.1. Culture des Caco-2 TC7 et des hépatocytes au sein de l'IIDMP et des Caco-2 TC7 en monoculture.....	100
2.2. Culture des hépatocytes au sein de l>IDCCM et en boîtes de Pétri	104
2.3. Estimation des paramètres et méthodes statistiques.....	106
2.4. Calcul des biodisponibilités hépatiques.....	107
2.5. Calcul des biodisponibilités intestinales	108
2.6. Calcul des biodisponibilités orales	109
VII. ANALYSE STATISTIQUE	110
 <u>CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA FAISABILITE DU DISPOSITIF.....</u>	 111
 <u>CHAPITRE 5 : COMPARAISON DU METABOLISME HEPATIQUE D'HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS CULTIVES DANS DES MICROSYSTEMES ET DANS DES BOÎTES DE PETRI</u>	 147

<u>CHAPITRE 6 : ETUDE DE L'ABSORPTION ET DU METABOLISME INTESTINAL ET HEPATIQUE DE LA PHENACETINE ET DE L'OMEPRAZOLE PAR UNE COCULTURE DE CACO-2 TC7 ET D' HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS</u>	182
<u>CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE</u>	222
I. OPTIMISATION DU FONCTIONNEMENT DE L'IIDMP	222
1. Développement initial du dispositif	222
2. Développements futurs du dispositif	224
II. EFFETS DE LA COCULTURE SUR LA VIABILITÉ ET FONCTIONNALITÉ DES CELLULES INTESTINALES ET HÉPATIQUES	226
III. EFFETS DE LA COCULTURE SUR L'ACTIVITÉ DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES DES CELLULES	229
IV. PERTINENCE DU DISPOSITIF IIDMP ET DU MODELE PK ASSOCIE	232
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	234
<u>REFERENCES</u>	238

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales étapes d'absorption, de distribution, métabolisme, excrétion et toxicité des xénobiotiques..	21
Figure 2 : Voies principales d'absorption et d'excrétion des xénobiotiques..	24
Figure 3 : Devenir d'un xénobiotique absorbé. Equilibre entre xénobiotiques libres et liés..	26
Figure 4 : Etapes du métabolisme des xénobiotiques.	32
Figure 5 : Propriétés et histologie de l'intestin grêle..	34
Figure 6 : Localisation anatomique et structure du foie..	40
Figure 7 : Effets de premier passage intestinaux et hépatiques et cycle entéro-hépatique...	41
Figure 8 : Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire..	42
Figure 9 : Principaux transporteurs exprimés par les hépatocytes.	44
Figure 10 : Exemple de cultures de cellules intestinales au sein de microsystèmes.	68
Figure 11 : Méthodes de culture in vitro alternatives innovantes d'hépatocytes et tissus hépatiques.....	74
Figure 12 : Dispositifs de coculture intestin/foie.	78
Figure 13 : Conception et structure des microsystèmes.	82
Figure 14 : Schéma d'une unité fonctionnelle de l'IIDMP.....	87
Figure 15 : Structure globale de l'IIDMP.	88
Figure 16 : Déroulement des expérimentations.	90
Figure 17: Représentation schématique du modèle PK associé au calcul des clairances intrinsèques propres à l'utilisation de l'IIDMP.....	101
Figure 18: Représentation schématique du modèle PK associé à la culture des Caco-2 TC7 en monoculture.....	101
Figure 19 : Représentation schématique du modèle PK associé à l'utilisation de l'IDCCM. .	104
Figure 20 : Représentation schématique du modèle PK associé à la culture des hépatocytes en boîtes de Pétri.	104
Figure 21 : Fonctionnement initial du dispositif de coculture intestin/foie.	223

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste et localisation des transporteurs ABC et SLC.	25
Tableau 2 : Niveau d'expression (quantité d'ARNm) des EMX de phase I de l'intestin et du foie.....	38
Tableau 3 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des principaux modèles permettant d'étudier le métabolisme et la toxicité des xénobiotiques oraux.....	52
Tableau 4 : Avantages et inconvénients des lignées cellulaires intestinales les plus utilisées pour suivre le transport des xénobiotiques.	60

LISTE DES ABREVIATIONS

μCCA	microscale Cell Culture Analog
ABC	ATP Binding Cassette
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
ATCC	American Type Culture Collection
BCRP	Breast Cancer Resistance Proteins
BMBI	BioMécanique et BioIngénierie
BSA	Bovine Serum Albumin
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CYP	CYtochromes P450
DAPI	4', 6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DDT	DichloroDiphénylTrichloroéthane
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
ERES	EthoxyRESorufin
EROD	EthoxyResorufin-O-Deethylase
FBS	Fetal Bovine Serum
GLUT	GLUcose Transporter
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBM	Hepatocytes Basal Medium
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCM	Hepatocyte Culture Medium
hEGF	Human Epidermal Growth Factor
HEPES	Hydroxy- EthylpiPerazine-N 0 2-EthaneSulfonic acid
IDCCM	Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems
IgG	Immunoglobulines de type G
IIDMP	Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform
IP	Iodure de Propidium

MCT	MonoCarboxylate Transporter
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDR	MultiDrug Resistance
MEM	Minimal Essential Medium
MRP	Multidrug Resistance associated Proteins
OAT	Organic Anion Transporter
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
OCT	Organic Cation Transporter
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetic
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	PolyDiméthylSiloxane
Pgp	P-glycoprotéine
PK	Pharmacokinetic
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène
PXR	Pregnane X Receptor
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SLC	SoLute Carrier
SULT	SULphoTransphérases
TEER	Trans-Epithelial Electrical Resistance
UGT	Uridine Diphosphate Glucuronosyl Transferase

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

De nouvelles méthodes *in vitro* permettant de retranscrire la complexité des conditions *in vivo* d'une meilleure façon que les méthodes classiques de culture *in vitro* ont été développées ces dernières années. En particulier, un certain nombre de ces méthodes consiste en l'utilisation de microsystèmes permettant la culture de cellules hépatiques au sein de microchambres. Cette méthode de culture permet de reproduire l'organisation en travée et en trois dimensions des hépatocytes au sein du foie [1,2] ou encore de mimer le microenvironnement cellulaire que l'on retrouve *in vivo* [3,4]. La culture dynamique au sein des microsystèmes permet de plus de limiter certains défauts des cultures *in vitro* traditionnelles comme la dédifférenciation rapide des hépatocytes primaires [5] ou encore les faibles capacités métaboliques des cellules hépatiques de lignée [6]. En effet, il a été montré que la culture dynamique au sein des microsystèmes était associée à une meilleure conservation des capacités métaboliques des hépatocytes primaires au cours du temps ou encore à une amélioration de la fonctionnalité des cellules de lignée [1,7–13].

L'utilisation de ces méthodes offre donc, entre autres, l'opportunité d'étudier de manière plus prédictive les différents événements conduisant à la potentielle toxicité de xénobiotiques. Toutefois, le développement de ces nouvelles méthodes innovantes n'est à l'heure actuelle pas suffisant pour répondre aux attentes des industries agrochimique, cosmétique ou encore pharmaceutique. En effet, ces secteurs sont concernés par un certain nombre de réglementations imposant non seulement de réduire le nombre d'animaux utilisés expérimentalement (voire même l'interdire complètement : directive européenne « Cosmétique » 7/768/CEE) tout en contraignant les industriels à augmenter le nombre de tests toxicologiques à pratiquer. On peut ainsi citer comme exemple le règlement européen REACH n°1907/2006 (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) qui impose aux industriels le test d'environ trente mille substances d'ici 2018 tout en recommandant l'utilisation des méthodes *in vitro* alternatives afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ces tests.

Un grand nombre des xénobiotiques étant absorbés oralement, le développement de méthodes *in vitro* aptes à mimer les effets de premiers passages intestinaux et hépatiques

s'avère particulièrement pertinent. En effet, ces deux organes sont parmi les principaux organes impliqués dans les processus d'Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion des xénobiotiques ingérés (ADME) [14–16]. L'intestin est ainsi l'organe qui est responsable de l'absorption de la majeure partie des xénobiotiques tandis que le foie est le premier site du métabolisme de ces derniers. De plus, l'intestin peut jouer un rôle particulièrement important dans la diminution de la biodisponibilité des xénobiotiques par l'intermédiaire d'un effet métabolique de premier passage.

C'est dans ce contexte que des méthodes *in vitro* alternatives reposant sur l'utilisation de microsystèmes ont été mises au point au sein du laboratoire de Biomécanique et bioingénierie (BMBI) de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC). Ces microsystèmes qui consistent en l'association de deux faces en polydiméthylsiloxane (PDMS) permettent notamment de cultiver des cellules hépatiques au sein de microcanaux sous un flux continu de milieu de culture [11,17,18]. Il a été montré que cette culture permettait d'améliorer le profil métabolique des cellules hépatiques issues de lignée, de conserver en partie les capacités d'hépatocytes primaires de rat au cours du temps ainsi que d'offrir un outil potentiel pour suivre le métabolisme de xénobiotiques [11–13,19,20].

Il est possible d'intégrer ces microsystèmes au sein de dispositifs comme le dispositif IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) [12,19]. Ce dernier permet de cultiver des cellules hépatiques au sein de 12 microsystèmes simultanément et offre une plateforme de culture compatible avec des systèmes expérimentaux extérieurs (microscope à fluorescence par exemple). De plus, sa conception est associée à une facilité de prélèvements et la possibilité de détacher et remettre facilement les microsystèmes en place ce qui facilite les analyses complémentaires (dosage, marquage, comptage...).

Ce dispositif a par la suite été amélioré ce qui a donné naissance à une nouvelle génération de boîtiers dont l'IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform). Ce dernier permet l'association d'une barrière intestinale à la culture dynamique de cellules hépatiques au sein des microsystèmes [13]. L'objectif du développement de ce dispositif est donc de proposer un outil permettant de tester les effets de premiers passages intestinal et hépatique subis par les xénobiotiques ainsi que d'étudier les interactions entre ces deux organes.

Avant d'utiliser l'IIDMP dans le cadre du test de métabolisme et de toxicité de xénobiotiques, il était nécessaire de l'optimiser et de vérifier sa fonctionnalité.

Pour cela, la première étape a été de tester son fonctionnement en utilisant des cellules intestinales et hépatiques issues de lignées (Caco-2 TC7 et HepG2 C3A), bien plus robustes et faciles d'utilisation que des cellules primaires. Durant cette première phase, nous avons cherché à optimiser le fonctionnement du dispositif et à montrer l'influence de la coculture dynamique sur la viabilité et fonctionnalité des cellules intestinales et hépatiques. En particulier, nous avons testé l'activité métabolique d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) de phase I : les cytochromes P450 de la sous-famille CYP1A. En effet, il avait été montré précédemment qu'une perfusion de cellules hépatiques de lignée et d'hépatocytes primaires de rat aboutissait à une augmentation de l'activité de ces cytochromes P450 (CYP) [11,21]. Nous avons donc voulu vérifier si nous retrouvions cette tendance après coculture de cellules intestinales et hépatiques au sein de l'IIDMP et si nous pouvions mettre en évidence d'éventuels phénomènes d'interactions entre cellules intestinales et hépatiques. Ces résultats ont fait l'objet d'un premier article inséré dans la suite de ce manuscrit.

Une fois cette étape effectuée, nous avons voulu tester l'influence de la coculture dynamique au sein de l'IIDMP sur des cellules intestinales de lignées et des hépatocytes primaires humains. Afin de bien différencier l'effet de la culture dynamique de l'effet d'une interaction entre cellules intestinales et hépatiques, nous avons commencé par tester l'influence de la culture dynamique sur l'activité du CYP1A2, CYP2C19 et CYP3A4 d'hépatocytes primaires humains. Pour cela, les hépatocytes primaires ont été cultivés en monoculture dynamique et leurs activités comparées à celles d'hépatocytes cultivés en boîtes de Pétri après exposition à deux molécules : la phénacétine et l'oméprazole. Ces activités ont été exprimées en clairance à l'aide d'un modèle pharmacocinétique (PK). Ces résultats ont fait l'objet du deuxième article inséré dans ce manuscrit.

Afin d'observer l'influence éventuelle d'une interaction entre cellules intestinales de lignée et hépatocytes primaires humains ainsi que des effets de premiers passages intestinaux, nous avons ensuite testé l'activité d'EMX de ces cellules pendant 24h de perfusion au sein de l'IIDMP. Les clairances et biodisponibilités orales de la phénacétine et

de l'oméprazole ont été calculées à l'aide d'un modèle PK puis comparées à celles obtenues à l'aide des méthodes classiques *in vitro* (monoculture de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires en Pétri). La pertinence de l'utilisation du dispositif IIDMP et de l'intégration des résultats d'absorption, et de métabolisme intestinal et hépatique obtenus dans un modèle PK a alors été discutée plus en détail dans le troisième article intégré à ce manuscrit.

Enfin, ce mémoire se termine par une discussion des résultats obtenus durant ce doctorat et par une mise en perspective de ceux-ci au sein d'une conclusion générale.

CHAPITRE 2 : BIBLIOGRAPHIE

I. PROCESSUS D'ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISME ET EXCRETION CONSECUTIFS AU CONTACT DE XENOBIOTIQUES AVEC L'ORGANISME

Notre organisme est en contact permanent avec des molécules exogènes appelées xénobiotiques qui peuvent être naturelles ou synthétiques. Certains de ces xénobiotiques sont absorbés par l'organisme après inhalation, simple contact avec la peau ou encore par ingestion. Cette dernière voie constitue l'une des voies les plus empruntées par les xénobiotiques. Le contact de l'organisme avec ces xénobiotiques est suivi d'un certain nombre de phases aboutissant à leur excrétion, accumulation et/ou toxicité.

Ces phases sont couramment divisées en 4 grandes étapes : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion (ADME). Suite à ces mécanismes, une cinquième phase peut être ajoutée, elle correspond à la toxicité potentielle du substrat initialement absorbé ou de ses dérivés issus du métabolisme des xénobiotiques (Figure 1) (ADMET). Ces différentes phases définissent la pharmacocinétique des substances thérapeutiques et permettent de comprendre les phénomènes aboutissant à une accumulation au sein de notre organisme de xénobiotiques potentiellement toxiques. Elles permettent aussi de calculer la fraction de xénobiotiques qui sera libérée dans le sang définissant ainsi la notion de biodisponibilité. La capacité des organes à éliminer ces xénobiotiques est appelée clairance. Enfin, l'étude des effets toxiques de ces xénobiotiques sur l'organisme constitue la pharmacodynamique (ou toxicodynamique).

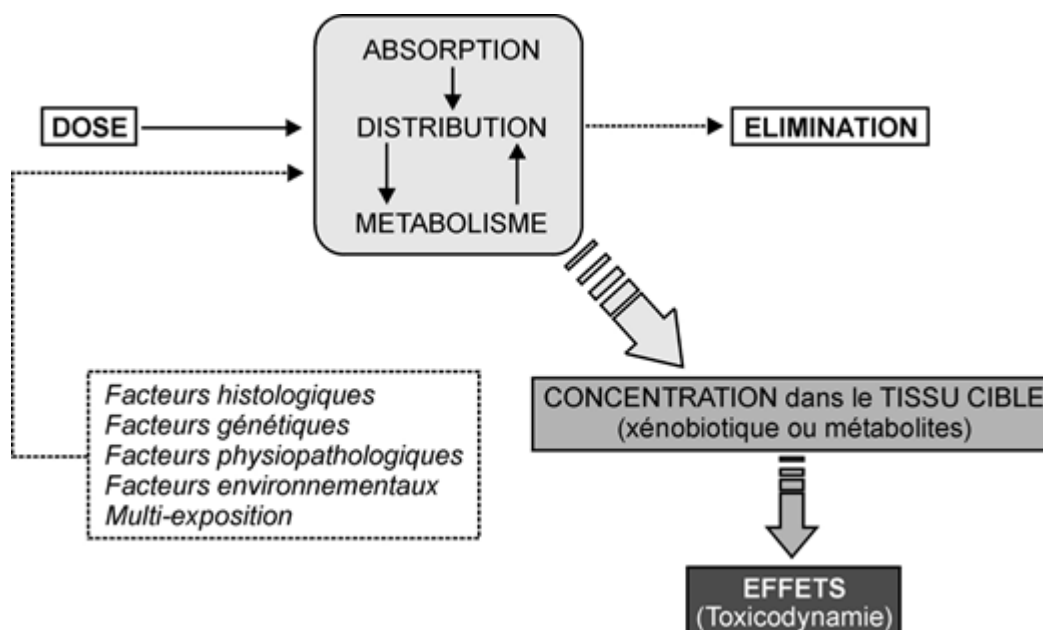


Figure 1 : Principales étapes d'absorption, de distribution, métabolisme, excrétion et toxicité des xénobiotiques. D'après Tolson, A.H. and Wang, H [22].

Il est important de noter que tous ces processus aboutissant au métabolisme, au stockage et à l'excrétion potentielle des xénobiotiques sont étroitement liés. Ainsi, si une substance est rapidement excrétée, elle sera peu distribuée, stockée/métabolisée et inversement. De plus, les processus d'excrétion ont bien souvent lieu en parallèle de la distribution et du métabolisme même si leurs descriptions sont séparées pour une meilleure lisibilité [16]. Enfin, dans certain cas, le site d'action est local et la toxicité ne fait pas suite à une distribution par la circulation sanguine. C'est le cas par exemple des xénobiotiques exerçant une toxicité directe sur l'épithélium cutané, respiratoire ou intestinal [16]. Nous décrirons par la suite les processus d'absorption, distribution, métabolisme et d'excrétion qu'empruntent classiquement les xénobiotiques oraux.

1. Absorption des xénobiotiques

La phase d'absorption est la phase qui aboutit à l'entrée des xénobiotiques au sein de l'organisme et plus particulièrement dans la circulation sanguine [23]. Suivant le type de composé et ses propriétés physiques, cette absorption peut se faire par trois voies d'entrée principales. On distingue généralement la voie cutanée de la voie pulmonaire et de la voie orale ou entérale, cette dernière étant majoritaire. Dans un certain nombre de cas, les xénobiotiques emprunteront la voie parentérale à la suite d'une injection (sous cutanée, intramusculaire ou intraveineuse) comme c'est le cas pour bon nombre de substances

thérapeutiques. Cette dernière voie permet de limiter les modifications des molécules injectées avant qu'elles n'aient atteint leurs sites d'action.

Pour atteindre la circulation systémique et leurs sites d'action, les xénobiotiques ingérés doivent traverser les barrières cellulaires comme celle de l'intestin, du foie...etc. En règle générale, ce sont les molécules les plus lipophiles qui seront les plus à même de traverser les barrières biologiques et membranes cellulaires composées d'un grand nombre de phospholipides. Au contraire, les molécules hydrosolubles auront tendance à être éliminées plus facilement [22].

A l'échelle cellulaire, le processus d'absorption peut se faire par différentes voies. On distingue couramment la voie paracellulaire qui consiste au passage entre les cellules des xénobiotiques de plus petites tailles et hydrophiles, de la voie transcellulaire où les xénobiotiques sont absorbés d'un côté par les cellules et relargués de l'autre côté (Figure 2) [24]. Le passage paracellulaire se fait de manière passive contrairement au passage transcellulaire qui peut se faire de manière passive ou active. Les mécanismes passifs d'absorption concernent la majorité des substances thérapeutiques [15].

Plus précisément et dans le cadre du passage transcellulaire passif, les molécules les plus lipophiles peuvent interagir avec la membrane plasmique qui va permettre leurs diffusions passives par invagination. Cette diffusion passive peut aussi se faire par l'intermédiaire de canaux et des pores comme les aquaporines qui permettent spécifiquement le passage de l'eau à travers les entérocytes. Enfin, la diffusion facilitée va permettre la diffusion de molécules par l'intermédiaire de transporteurs en suivant un gradient électrochimique [15] (Figure 2).

Un certain nombre de molécules n'empruntent pas ces voies de transport passif et traversent les cellules dans le sens inverse des gradients de concentration. Ce passage nécessite alors l'intervention de transporteurs localisés dans les membranes cellulaires et utilisant de l'énergie pour fonctionner, c'est pourquoi on parle de transport actif [25].

Ces transporteurs peuvent être classés selon l'énergie qu'ils requièrent pour faciliter le transport des molécules : il s'agit du passage actif primaire et secondaire. Le passage primaire utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse d'un ATP en ADP. Le transport actif

secondaire utilise de l'énergie issue du gradient ionique (Ca^{2+} , Na^{2+} , H^{+}) généré par le fonctionnement de pompes ioniques. Ces transporteurs sont donc plus communément divisés en 2 catégories : les transporteurs membranaires ABC qui assurent le transport primaire, au contraire des transporteurs SLC qui assurent le transport facilité et actif secondaire [26,27]. La famille des transporteurs ABC est composée de trois types de transporteurs : les Multidrug Resistance associated Proteins MRP dont 9 membres ont été identifiés (MRP1, 2...9), la P-glycoprotéine ou MDR1 qui va être impliquée dans l'efflux de nombreux xénobiotiques et les Breast Cancer Resistance BCRP. Ces trois types de transporteurs vont être impliqués dans l'efflux des xénobiotiques vers la lumière des organes ou les vaisseaux sanguins lorsqu'ils sont situés respectivement en apical ou en basal des cellules [27,28] (Tableau 1). Ils vont donc jouer un rôle déterminant dans la quantité de xénobiotiques biodisponibles (Figure 2). La famille des transporteurs SLC n'utilise pas directement l'ATP mais l'énergie produite par le gradient électrochimique d'un transport primaire. Il en existe de nombreux qui vont permettre l'absorption des xénobiotiques comme les transporteurs d'anions et de cations organiques (OAT et OCT par exemple), les transporteurs de monocarboxylates (MCT par exemple), etc. Ils permettent l'absorption des molécules et seront situés en apical ou en basal des cellules (Tableau 1). Il est intéressant de noter que ces deux grandes catégories de transporteur possèdent des propriétés communes particulièrement importantes à prendre en compte dans le cadre d'études de toxicologie et pharmacocinétique. Ils peuvent ainsi être induits, inhibés ou encore saturés [27].

Enfin, certains xénobiotiques peuvent traverser les membranes cellulaires par l'intermédiaire de l'endocytose. Lors de ce processus, les molécules sont reconnues par les membranes cellulaires qui les transfèrent à l'intérieur du cytoplasme des cellules par l'intermédiaire de vésicules appelées endosomes. Ces endosomes peuvent alors potentiellement les relarguer de l'autre côté des cellules [14] (Figure 2).

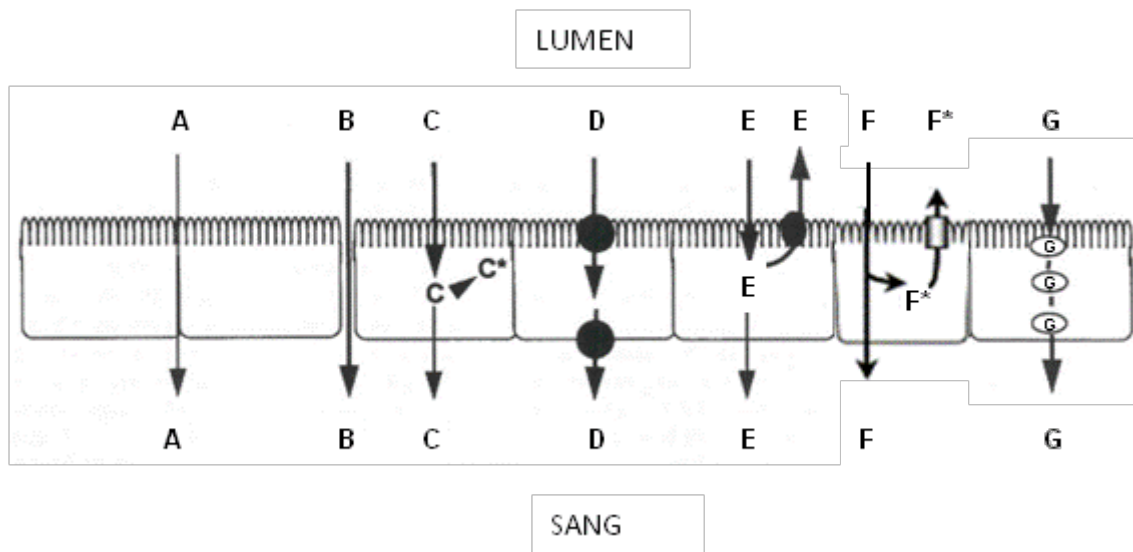


Figure 2 : Voies principales d'absorption et d'excrétion des xénobiotiques. Exemple de la barrière intestinale.
 (A) La voie d'absorption paracellulaire se fait entre les jonctions des cellules. (B) La voie paracellulaire peut être rendue plus perméable suite à une modulation de l'expression des protéines constitutives des jonctions serrées. (C) Le transfert facilité se fait le long d'un gradient chimique et peut être lié au métabolisme des xénobiotiques parents en métabolites (C*). (D) Le transport actif peut se faire dans le sens de l'influx. (E) Le transport actif peut être majoritaire dans le sens de l'efflux par l'intermédiaire de transporteurs et ainsi limiter l'absorption de xénobiotiques. (F) L'activité des EMX et transporteurs d'efflux peuvent être coordonnées ce qui permet l'excrétion des xénobiotiques parents. (G) Transport transcellulaire par l'intermédiaire de vésicules. D'après Hunter, J. and Hirst, B.H. [25].

Transporteurs	Gènes	Localisation tissulaire	Direction du transport
Ppg/MDR1	ABCB1	Intestins, foie, reins, autres	Cellules vers lumen
BSEP	ABCB11	Foie	Cellules vers bile
MRP2	ABCC2	Intestins, foie, reins, autres	Cellules vers lumen
MRP3	ABCC3	Intestins, foie, reins, autres	Cellules vers sang (foie)
MRP4	ABCC4	Ubiquitaire	Cellules vers sang (foie)
BCRP	ABCG2	Intestins, foie, reins, autres	Cellules vers lumen
NTCP	SLC10A1	Foie	Sang vers cellules
ASBT	SLC10A2	Intestins	Intestin vers cellules
PEPT1	SLC15A1	Intestins	Intestin vers cellules
MCT1	SLC16A1	Ubiquitaire	Lumen vers cellules
GLUTs	SLC2 family	Ubiquitaire	Cellules vers sang
OCT1	SLC22A1	Foie	Sang vers cellules
OCT3	SLC22A3	Ubiquitaire	Sang vers cellules
OCTN1	SLC22A4	Ubiquitaire	Sang vers cellules
OAT2	SLC22A7	Foie	Sang vers cellules
MATE1	SLC47A1	Reins, Foie	Cellules vers lumen
SGLTs	SLC5	Ubiquitaire	Lumen vers cellules
OST	SLC51A1 and A1BP	Intestins	Cellules vers sang
OATP1A2	SLCO1A2	Cerveau, reins, foie	Sang vers cellules
OATP1B1	SLCO1B1	Foie	Sang vers cellules
OATP1B3	SLCO1B3	Foie	Sang vers cellules
OATB2B1	SLCO2B1	Foie, intestins	Sang vers cellules

Tableau 1 : Liste et localisation des transporteurs ABC et SLC. D'après Keogh, J.P [27].

2. Distribution des xénobiotiques

Une fois que les xénobiotiques atteignent la circulation sanguine, ils sont transportés sous forme libre ou liée aux protéines plasmatiques. Un équilibre et des transferts permanents vont avoir lieu entre le plasma, le liquide interstitiel et le liquide intracellulaire [29] (Figure 3). Leur vitesse de distribution va dépendre avant tout du débit sanguin. En effet, les organes très vascularisés (foie, reins, cœur...) ont tendance à être en contact rapidement avec une plus grande quantité de xénobiotiques que les organes peu vascularisés (os, tissus adipeux). Toutefois, d'autres paramètres sont aussi particulièrement importants comme l'affinité des xénobiotiques pour les tissus et leur vitesse d'absorption par les sites d'accumulation qui ne

sont pas nécessairement les sites d'action. Ces sites de liaisons et stockages diffèrent selon les propriétés physico chimiques des xénobiotiques. Il peut s'agir notamment des protéines plasmatiques comme l'albumine, des tissus comme les tissus adipeux et osseux ou encore d'organes comme le rein, le foie etc. Cette liaison pourra être réversible ou irréversible. Dans le cas d'une liaison réversible un équilibre pourra alors se créer au niveau des sites d'accumulation entre xénobiotiques stockés et circulants [29] (Figure 3). Lorsque la concentration de xénobiotiques circulants diminuera, il y aura alors redistribution des xénobiotiques stockés. On peut ainsi citer l'exemple des pesticides organochlorés comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) qui vont s'accumuler en priorité dans le tissu adipeux du fait de leur bonne liposolubilité. Une fois relargués par les tissus adipeux (suite à un amaigrissement par exemple), ces derniers produiront *in fine* un effet toxique sur la barrière testiculaire [26]. Enfin, les barrières tissulaires peuvent grandement influencer la biodisponibilité des xénobiotiques. Par exemple, la présence de nombreux transporteurs d'efflux mais aussi les propriétés physiologiques des barrières biologiques comme la barrière intestinale et hémato-encéphalique vont limiter la diffusion des xénobiotiques vers le foie ou l'encéphale [16]. Ces données de distribution sont donc particulièrement importantes à prendre en compte pour déterminer la biodisponibilité et le stockage des substances thérapeutiques et plus généralement des xénobiotiques potentiellement toxiques.

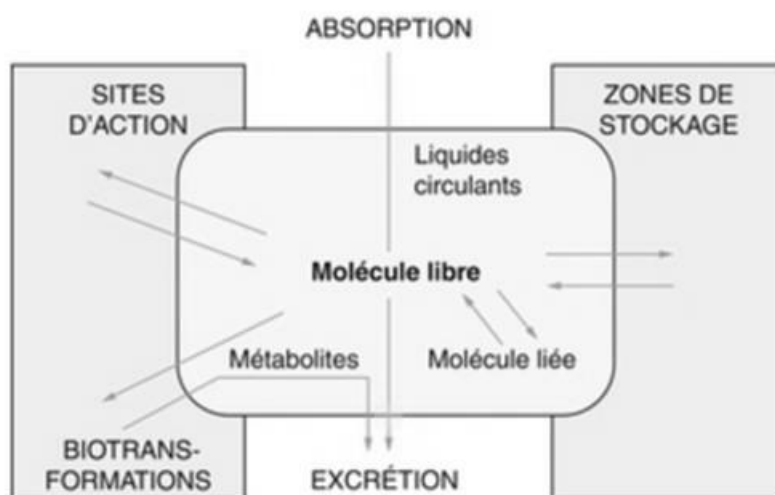


Figure 3 : Devenir d'un xénobiotique absorbé. Equilibre entre xénobiotiques libres et liés. D'après Clère, N. et al. [15].

3. Métabolisme et excrétion des xénobiotiques

Une fois les xénobiotiques absorbés par l'organisme, il va se produire des mécanismes de détoxification qui vont potentiellement aboutir à leur excrétion. En règle générale, les molécules lipophiles qui franchissent facilement les barrières biologiques comme la paroi intestinale sont rendus plus hydrophiles ce qui favorise leur excrétion [26]. Ce mécanisme naturel appelé biotransformation ou métabolisme des xénobiotiques permet de limiter la toxicité de nombreux xénobiotiques mais aussi la biodisponibilité de molécules thérapeutiques. Ce métabolisme peut être à l'origine de l'apparition de métabolites encore plus toxiques que les xénobiotiques parents absorbés initialement. Cette troisième étape du processus ADME est donc particulièrement importante à prendre en compte dans les études de toxicité et de pharmacocinétique.

Ce métabolisme est permis par l'activité de différentes enzymes agissant en synergie et appelées enzyme du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Ces EMX qui ont une large spécificité de substrat allant des substances endogènes aux xénobiotiques sont classées en deux grandes catégories : les EMX de phase I (3.1) et les EMX phase II ; l'action de détoxification des EMX est complétée par des systèmes de transport, dits de phase III, qui permettent l'expulsion des xénobiotiques ou de leur(s) métabolite(s) hors de la cellule.

3.1. Métabolisme de phase I

Les EMX de phase I sont des mono oxygénases qui catalysent des réactions d'hydrolyse et d'oxydoréduction en libérant ou en introduisant des groupements fonctionnels (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) ce qui aboutit à l'augmentation de la polarité des xénobiotiques absorbés. Cette phase dite de « fonctionnalisation » va préparer la phase d'excrétion des xénobiotiques parents (Figure 4). Leur activité est particulièrement importante puisqu'elle permet 90% du métabolisme des molécules thérapeutiques. Actuellement, plus de 2000 substrats ont été identifiés [30]. Ces EMX sont essentiellement des cytochromes P450 (CYP) codés par une famille de 57 gènes et ancrés dans les membranes des mitochondries ou du réticulum endoplasmique. Ces CYPs ont eux-mêmes été subdivisés en familles dont les familles 1, 2 et 3 sont principalement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques chez les mammifères [30].

➤ La famille CYP1

Cette famille est principalement constituée de trois isoformes : le CYP1A1, 1A2 et 1B1. L'expression des gènes codant pour ces EMX est régulée par le xénosenseur AhR et induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). L'expression du CYP1A1 et 1B1 est principalement extrahépatique à l'inverse du CYP1A2 exprimé essentiellement dans le foie et qui est quantitativement la troisième isoenzyme la plus importante de cet organe. Le CYP1B1 est l'unique représentant de la sous-famille CYP1B et représente moins de 1% du total des CYPs contenus par le foie.

➤ La famille CYP2

Cette famille constitue la plus grande famille de CYPs chez l'Homme. Ces EMX ne partagent pas toutes les mêmes voies de régulation. Nous nous concentrerons sur le CYP2C19 qui joue un rôle particulièrement important dans le métabolisme de xénobiotiques et plus particulièrement de molécules thérapeutiques puisqu'il est à l'origine du métabolisme de 25% des substances thérapeutiques utilisées en clinique [30].

➤ La famille CYP3

Cette famille est constituée du CYP3A4, 3A5, 3A7 et 3A43. Le CYP3A4 joue un rôle particulièrement important puisqu'il est à l'origine du métabolisme de plus de 50% des molécules thérapeutiques actuellement utilisées [31]. Cette enzyme va limiter la biodisponibilité de nombreuses molécules thérapeutiques, en particulier dans l'intestin et le foie où elle constitue l'enzyme de phase I la plus exprimée [32]. Elle est aussi à l'origine du métabolisme de substances endogènes comme la testostérone et peut être induite et réprimée par de nombreux xénobiotiques. Ainsi, l'exemple le plus connu concerne l'inhibition de son activité par l'absorption de jus de pamplemousse. Une autre de ses particularités est le lien étroit qui existe entre certains substrats de ce CYP et l'activité de la Pgp [33].

Il est important de noter que l'expression et les spécificités de substrats de ces CYPs peuvent être différentes d'une espèce à une autre d'où les problèmes d'extrapolation à l'Homme des résultats de pharmacocinétique et de toxicologie obtenus après

expérimentation chez l'animal. De plus, cette expression varie aussi d'un individu à l'autre pour des raisons génétiques mais aussi suivant des paramètres comme l'âge, le sexe, l'ethnie...etc. Cette variabilité va jouer un rôle important chez un sujet donné s'il est exposé à un xénobiotique potentiellement toxique. Selon l'expression de ses EMX, un individu pourra être plus ou moins sensible à la production de métabolites toxiques.

Ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques ont de nombreuses particularités : certaines peuvent métaboliser plusieurs substrats et elles ont une faible activité basale mais sont fortement inductibles. La voie d'activation de ces CYPs peut se faire sous l'influence de facteurs de transcription aussi appelés xénosenseurs [26]. De manière générale, les xénosenseurs sont liés à des protéines cytoplasmiques ou nucléaires et sont donc bloqués. En présence de leurs ligands qui peuvent être des molécules endogènes (stéroïdes, acides gras par exemple) ou exogènes (xénobiotiques), ils vont être libérés de l'action de ces protéines et vont alors activer des gènes régulant l'activité d'EMX cibles [31]. Par cette voie, ces récepteurs vont détecter la présence de xénobiotiques dans la cellule ce qui va permettre l'activation des EMX les plus appropriées pour désactiver et éliminer ces composés.

Il faut noter que ces récepteurs ont une faible affinité et spécificité de ligands. Pour cette raison, de nombreuses molécules pourront les activer et cette activation pourra entraîner la régulation de l'activité d'autres facteurs de transcription. Cela pourra alors aboutir à la régulation de fonctions physiologiques comme l'homéostasie des acides biliaires et du glucose, le métabolisme des lipides et l'inflammation. Par cette voie, l'absorption de xénobiotiques par les cellules pourra influencer de façon positive ou négative des fonctions biologiques diverses. De même, l'activation de ces xénosenseurs pourra être liée à la régulation de l'activité de nombreux transporteurs [34].

Il est donc clair que ces récepteurs jouent un rôle central dans la coordination et la régulation des EMX et dans la quantité et la toxicité de xénobiotiques biodisponibles après absorption. Trois de ces récepteurs sont particulièrement impliqués dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques de phase I et II. Il s'agit de récepteurs nucléaires comme l'Ahr (aryl hydrocarbon receptor), le PXR (pregnane X receptor) ou le CAR (constitutive androstane receptor).

3.2. Métabolisme de phase II et excrétion

Les réactions de phase I vues précédemment pourront être suivies de réactions de phase II. Ces réactions consistent en la conjugaison des xénobiotiques ou de leurs métabolites avec des composés endogènes, ce qui permet principalement d'augmenter leur hydrosolubilité et favoriser leur excrétion. Elles sont principalement hépatiques et localisées dans le cytosol et le réticulum endoplasmique des hépatocytes. On distingue six réactions de conjugaison principales dont la glucuro-conjugaison est majoritaire. Elle consiste en la conjugaison d'acide glucuronique aux composés initiaux ce qui favorise alors leur excrétion par la bile ou les reins. Cela concerne des molécules comme par exemple le paracétamol. Il existe d'autres réactions de conjugaison comme l'addition de groupements acétyl, de glutathion, de groupement sulfonate, acétyl et méthyl ou encore d'acides aminés [35] (Figure 4) aux composés d'intérêt.

Cette étape de phase II permet d'améliorer l'hydrosolubilité des cibles et donc de favoriser leur excrétion par les cellules tout en les désactivant. De même que les enzymes de phase I, celles de phase II ont une activité régulable. Il est important de noter que ce métabolisme de phase II ne succède pas obligatoirement au métabolisme de phase I. Ainsi, des xénobiotiques peuvent être seulement métabolisés par des enzymes de phase I ou par des enzymes de phase II [26].

Lors de la phase d'excrétion, l'organisme peut se débarrasser de xénobiotiques initialement absorbés.

Cette phase va être permise tout d'abord au niveau cellulaire par les systèmes de transport dits de phase III qui vont permettre l'expulsion des xénobiotiques hors des cellules (Figure 2). Ces transports impliqués aussi dans l'absorption des xénobiotiques ont été décrits précédemment. Il s'agit des transporteurs appartenant à la famille des ABC et SLC. Il est possible de suivre l'activité de certains transporteurs d'efflux impliqués dans les processus d'excrétion hépatique ou encore d'excrétion des xénobiotiques vers la lumière intestinale par le suivi de l'excrétion de substrats fluorescents. En particulier, l'activité de la glycoprotéine P (Pgp) peut être suivie lors des expérimentations *in vitro* à l'aide de l'un de ces substrats : la rhodamine 123 [36]. Ce substrat fluorescent sera excrété hors de la cellule par la Pgp et son flux donnera donc une indication sur l'activité de ce transporteur [28].

Par le processus d'excrétion globale, les xénobiotiques et/ou leurs métabolites seront expulsés hors de l'organisme via la bile puis les fèces (excrétion hépatique) ou encore via le sang puis l'urine (excrétion rénale) (Tableau 1). Cette dernière voie d'excrétion est d'ailleurs majoritaire en particulier pour les composés hydrosolubles. Ces composés seront en effet aptes à passer la barrière rénale en suivant 2 voies principales d'excrétion du plasma vers l'urine [37] :

- la filtration glomérulaire, majoritaire, est un transport passif qui concerne principalement les molécules dont le poids est inférieur à 65 Kda et donc plus particulièrement les molécules circulant sous forme libre.

- la sécrétion tubulaire est un transport actif permettant l'excrétion des acides et bases faibles qui reste négligeable devant la filtration glomérulaire

Une voie permet aussi l'absorption de composés de l'urine vers le plasma, il s'agit de la réabsorption tubulaire. Ce transport passif concerne particulièrement les acides et bases faibles.

Une fois excrétés dans l'urine ou dans la bile puis les fèces, les xénobiotiques et/ou leurs métabolites sont définitivement éliminés. D'autres voies d'excrétion sont possibles comme le lait maternel, l'air expiré, la salive, les cheveux etc. mais sont minoritaires.

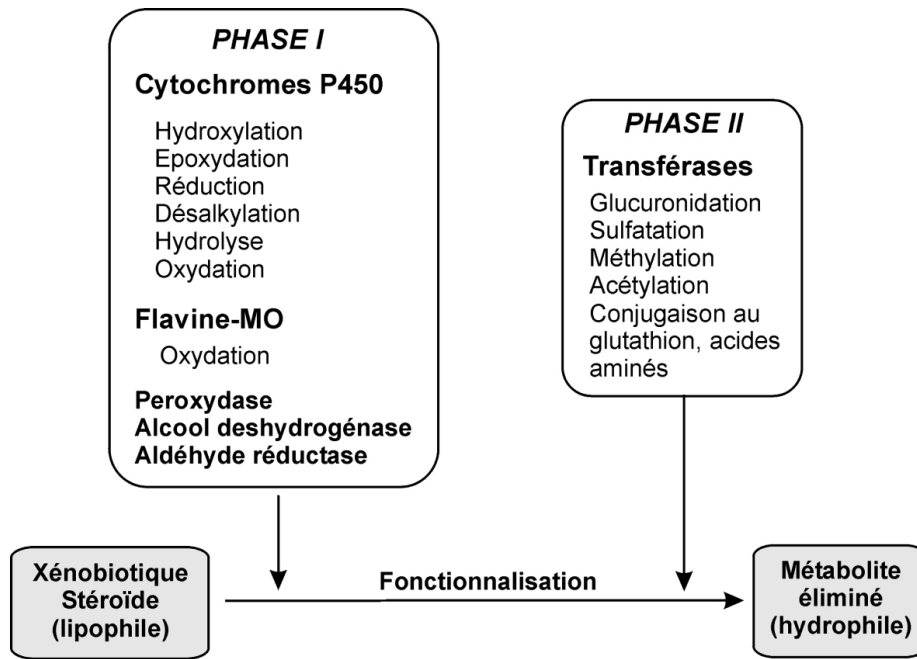


Figure 4 : Etapes du métabolisme des xénobiotiques. D'après Tolson, A.H. and Wang, H. [22].

Nous avons donc vu les mécanismes consécutifs à l'absorption de xénobiotiques par notre organisme (Figure 4). Classiquement et schématiquement, les xénobiotiques sont absorbés et métabolisés par le tractus digestif (en particulier l'intestin) puis dirigés directement vers le foie où ils subissent de nouvelles étapes de métabolisme avant d'être excrétés vers l'urine ou les fèces. Ces effets de premiers passages intestinaux et hépatiques jouent donc un rôle prépondérant dans l'absorption, le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques.

II. CYCLE ENTERO HEPATIQUE ET EFFETS DE PREMIER PASSAGE

1. Propriétés et paramètres d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion de l'intestin grêle.

Comme il a été vu précédemment, l'absorption orale est majoritaire. Elle concerne en particulier tous les xénobiotiques ingérés voire les grosses particules inhalées ainsi que la majorité des substances thérapeutiques. En effet, cette voie étant non invasive pour le patient, elle est privilégiée. Une fois les xénobiotiques ingérés, les sites d'absorption pourront être multiples : au niveau buccal, de l'estomac ou encore des intestins. C'est l'intestin qui est le site principal d'absorption des nutriments et xénobiotiques oraux. Il est composé plus particulièrement de l'intestin grêle et du gros intestin. Nous nous focaliserons par la suite sur les propriétés de l'intestin grêle qui permet majoritairement l'absorption des nutriments et xénobiotiques oraux vers la circulation sanguine. Au contraire, le gros intestin est principalement impliqué dans le stockage et la formation des fèces. Ainsi, sur les 9L quotidien de sécrétions digestives et de l'alimentation transitant dans l'intestin grêle, seulement 2L sont retrouvés dans le colon [38].

1.1. Propriétés de l'intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe impliqué dans l'absorption des nutriments et est anatomiquement composé de trois parties : le duodenum, le jejunum et l'ileon. Cette absorption est permise par les propriétés aussi bien physiologiques qu'histologiques de cet organe. De plus, l'intestin grêle joue un rôle de barrière crucial qui permet de limiter l'absorption de certains xénobiotiques potentiellement toxiques [39].

Cet organe est composé de trois couches successives, une couche séreuse, musculuse et muqueuse (Figure 5). La muqueuse forme des replis appelés valvules conniventes qui accroissent les capacités d'absorption de l'intestin (Figure 5). La muqueuse peut être décomposée en deux parties : une partie composée des villosités et une partie de cryptes (ou glandes) de Lieberkühn. Les villosités augmentent la surface d'échange disponible jusqu'à 300 m² au total et sont recouvertes d'un épithélium de revêtement (Figure 5). Ces structures viennent donc accroître les capacités absorbatives de l'intestin.

Cette capacité d'absorption est d'autant plus importante que la taille de l'intestin varie de 4 à 6 mètres et que son épithélium présente des propriétés bien particulières [40].

L'épithélium intestinal forme une monocouche simple reposant sur la *lamina propria* contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques et est composé de plusieurs types cellulaires dont les entérocytes sont les plus nombreux (>90% des cellules de la barrière intestinale) [41]. Ces cellules sont polarisées et présentent des microvillosités apicales qui vont permettre l'absorption des nutriments et xénobiotiques par l'intestin et augmenter considérablement la surface d'échange disponible. Ces microvillosités sont recouvertes d'une couche de polysaccharides appelés glycocalyx. L'ensemble microvillosités et glycocalyx est appelé bordure en brosse (Figure 5) [38]. Trois structures sont donc à l'origine des hautes capacités d'absorption de l'intestin grêle : les valvules, les villosités et les microvillosités (Figure 5).

De plus, de nombreuses enzymes hydrolytiques (phosphatase alcaline, peptidase...etc.) sont présentes au niveau de la bordure en brosse et permettent les dernières étapes d'hydrolyse des nutriments et xénobiotiques oraux avant leur transport vers la circulation sanguine.

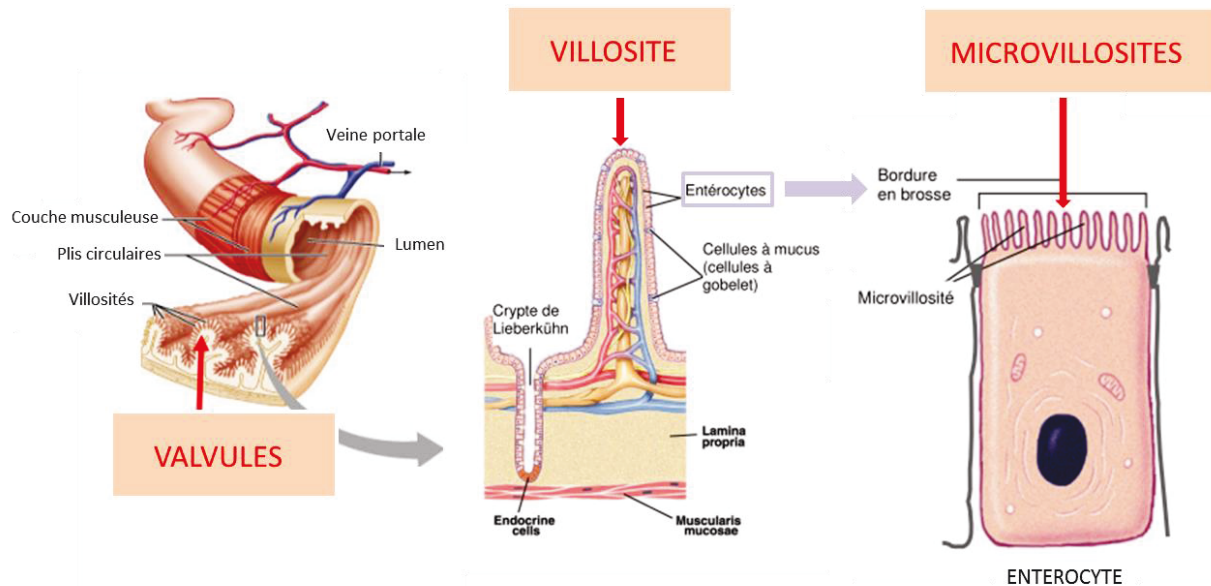


Figure 5 : Propriétés et histologie de l'intestin grêle. Structures impliquées dans la capacité d'absorption intestinale. D'après Marieb, E.N. and Hoehn, K. [40].

Les entérocytes se forment dans les cryptes de Lieberkühn puis migrent vers les villosités lors de leur différenciation. D'autres types cellulaires sont aussi présents dans les

villosités comme des cellules immunitaires (M) et des cellules calciformes productrices de mucus (Figure 5). Ce dernier constitue une protection de la paroi intestinale.

La cohésion entre les cellules et donc de la barrière intestinale se fait par l'intermédiaire de différents types de jonctions comme les jonctions communicantes et les jonctions serrées. Les jonctions communicantes assurent la communication des cellules entre elles par l'intermédiaire de canaux aqueux et donc le passage de petites molécules (glucose, acides aminés) permettant le couplage métabolique et électrique des cellules voisines. Les jonctions serrées joignent étroitement entre elles les cellules épithéliales au niveau apical et permettent par ce biais de limiter la perméabilité de l'épithélium intestinal. Elles constituent la zonula occludens et sont formées, entre autres, de protéines comme les claudines et occludines.

1.2. Absorption et excrétion intestinale

Les substances thérapeutiques et plus généralement les xénobiotiques ingérés sont dissous et subissent de nombreuses modifications enzymatiques dans l'estomac où ils sont intégrés au bol alimentaire pour former ce que l'on appelle le chyme [42]. Ils peuvent ensuite franchir la couche aqueuse de l'intestin, le mucus qui protège l'intestin de l'acidité du chyme, être absorbés par les cellules épithéliales de l'intestin, franchir la lame basale sur laquelle repose ces cellules épithéliales pour enfin gagner la circulation sanguine par les capillaires et être distribués vers leurs organes cibles.

Avant d'atteindre la circulation sanguine, les molécules devront donc traverser un certain nombre de barrière biologiques. Elles devront tout d'abord passer la barrière constituée par le mucus intestinal couvrant la muqueuse de l'intestin grêle. Elles subiront ensuite potentiellement des phases d'hydrolyse et de modifications par les enzymes présentes dans la bordure en brosse et pourront être métabolisées directement par la flore microbienne intestinale [27,28].

Au niveau des entérocytes, le passage pourra se faire de manière paracellulaire ou transcellulaire (Figure 2).

➤ Les molécules passant par la voie paracellulaire sont habituellement polaires ou fortement hydrosolubles. Ces xénobiotiques sont la plupart du temps des petites molécules (< 15 nm), des électrolytes et de l'eau, aptes à traverser les jonctions serrées dans le sens du

gradient de concentration. Ce passage est toutefois limité par rapport au transport transcellulaire même si certains signaux vont l'augmenter en entraînant un relâchement des jonctions serrées [44] (Figure 2) comme c'est le cas par exemple de certaines toxines bactériennes ou de certains pesticides [30,31]. La perméabilité est donc liée à l'état des jonctions serrées et peut être caractérisée par des mesures de flux ioniques (résistance électrique transépithéliale) et de molécules fluorescentes (comme le jaune Lucifer par exemple) à travers les jonctions serrées [47].

➤ Du fait de la grande surface d'absorption permise, entre autres, par les microvillosités (1000 fois supérieure à celle que l'on retrouve entre les cellules), la voie transcellulaire est la plus empruntée par les xénobiotiques. Ce transport peut se faire sous l'action des transporteurs qui prennent en charge les nutriments et composés endogènes mais aussi les xénobiotiques qui leur sont similaires d'un point de vue structurel [42]. Ce transport pourra être pris en charge par les transporteurs SLC dans le sens de l'absorption et ABC dans le sens de l'excrétion comme décrit dans la partie détaillant les processus d'ADME (Tableau 1). Ces transporteurs jouent un rôle prépondérant dans la quantité de xénobiotiques absorbés ou excrétés par l'intestin. Il a été montré que la plupart des transporteurs SLC et ABC étaient largement exprimés par l'intestin [41,48] même si l'expression de ces transporteurs varie d'une zone à l'autre de l'intestin grêle [42]. Cette expression tend à diminuer le long de l'intestin [49]. L'expression de ces transporteurs peut de plus parfois être étroitement liée à celle d'EMX de phase I et II. Ainsi, un de ces transporteurs est particulièrement étudié du fait de son implication dans l'excrétion de nombreux xénobiotiques. Il s'agit de la Pgp appartenant à la famille des transporteurs ABC. Ce transporteur va limiter l'absorption intestinale d'un certain nombre de xénobiotiques et partage de nombreux substrats avec le CYP3A4 [28,50], le CYP le plus exprimé dans l'intestin grêle et le foie. Cette protéine qui est impliquée notamment dans la résistance de certains cancers à des molécules thérapeutiques [51] est particulièrement exprimée dans des organes comme l'intestin grêle. Elle est aussi impliquée dans l'excrétion de xénobiotiques hors du foie vers la bile et l'urine et possède de nombreux substrats [52]. Elle joue donc un rôle majeur dans la protection de l'organisme face aux agressions de xénobiotiques toxiques et aussi en modifiant la biodisponibilité orale de nombreuses substances thérapeutiques.

La plupart de ces transporteurs sont exprimés aussi bien dans l'intestin que dans le foie à des niveaux d'expression toutefois différents (Tableau 1). C'est pour cette raison que les tests *in vitro* et *in vivo* d'absorption et d'excrétion constituent une étape primordiale dans le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques afin de ne pas sous-estimer l'impact de l'activité de ces transporteurs sur la biodisponibilité des substances testées [41].

Un certain nombre de facteurs jouent un rôle prédominant sur cette absorption intestinale. On peut tout d'abord citer les propriétés physico-chimiques des xénobiotiques comme la taille des molécules, leur conformation, leur propriété hydrophobe/hydrophile...etc. qui peuvent grandement influencer sur leur affinité avec les transporteurs et enzymes et donc limiter ou augmenter leur absorption et leur biodisponibilité. De même, les excipients utilisés dans la fabrication des substances pharmaceutiques ou la matrice alimentaire dans laquelle les xénobiotiques sont inclus pourront limiter ou au contraire accentuer l'absorption intestinale [15,42]. Les propriétés physiologiques de l'intestin sont aussi à prendre en compte. En effet, les variations de transit ou encore de pH entre les différentes parties de cet organe vont influencer sur l'absorption des xénobiotiques oraux et sur leur biodisponibilité [53].

1.3. Métabolisme intestinal

Une fois absorbés par les entérocytes les xénobiotiques gagnent la plupart du temps directement le foie par l'intermédiaire de la veine porte avant d'être redistribués vers la circulation générale. Même si le site principal du métabolisme des xénobiotiques est le foie, un certain nombre de molécules pourront être métabolisées par le tractus gastro-intestinal et en particulier par l'intestin grêle. Ce processus appelé « effet de premier passage intestinal » est particulièrement important puisqu'il pourra être à l'origine du métabolisme d'une substance thérapeutique avant qu'elle n'ait atteint son site d'action. Ainsi, l'intestin et le foie expriment de nombreuses EMX communes mais pas dans les mêmes proportions et niveaux d'expression [42] (Tableau 2). En particulier, le CYP3A4 représente 70% des EMX de phase I de l'intestin et va donc être à l'origine du métabolisme de nombreux substrats comme la cyclosporine, le verapamil et le midazolam dès leur premier passage intestinal et limiter leur biodisponibilité. Ainsi, en terme de niveau d'ARNm, le CYP3A4 est autant

exprimé dans l'intestin que le foie [54] et va être à l'origine du métabolisme de 80% des xénobiotiques métabolisés par l'intestin [41]. Les enzymes de la sous-famille CYP2C jouent aussi un rôle particulièrement important dans le métabolisme des xénobiotiques par les entérocytes puisqu'il permet le métabolisme de 15% des xénobiotiques métabolisés par l'intestin [53,54].

EMX de phase I	Intestin grêle	Foie
CYP1A1	+	++
CYP1A2	-	+++
CYP1B1	+	+
CYP2 J2	++/+	++
CYP2A13	+/-	+++
CYP2A6	-	+++
CYP2B6	++/+	+++
CYP2C19	++	+++
CYP2C8	+	+++
CYP2C9	++	+++
CYP2D6	++/+	+++
CYP2E1	++/+	+++
CYP2F1	-	-
CYP2R1	+	+
CYP2S1	++/+	-
CYP3A4	+++	+++
CYP3A43	-	+++
CYP3A5	+++ / ++	+++ / ++
CYP3A7	+/-	+

Tableau 2 : Niveau d'expression (quantité d'ARNm) des EMX de phase I de l'intestin et du foie. D'après Pavak, P. and Dvorak, Z. [54].

De même, les enzymes de phase II sont largement exprimées dans la muqueuse intestinale et vont donc contribuer en grande partie à l'effet de premier passage intestinal. Il faut toutefois noter que les CYPs sont uniquement exprimés dans les entérocytes qui représentent une petite fraction de la population cellulaire intestinale et que les niveaux d'expression et la quantité des EMX intestinaux de phase I et II vont avoir tendance à diminuer le long de l'intestin grêle [42].

Ce métabolisme intestinal peut limiter de manière notable la biodisponibilité des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites même si l'on considère que l'intestin a un métabolisme 30 à 200 fois plus faible que celui du foie [42].

Une fois absorbés par l'intestin, une grande proportion des xénobiotiques est dirigée directement vers le foie, organe central pour son rôle dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques.

2. Propriétés du foie et paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion hépatiques

2.1. Propriétés du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain. Il assure de nombreuses fonctions aussi bien de stockage que de métabolisme du glucose, des lipides ou encore des protéines et la production de bile et d'urée. Il participe au stockage des vitamines et du fer, au traitement des éléments du sang comme les hématies et leucocytes et au métabolisme des stéroïdes. Cet organe est aussi l'organe qui joue le rôle principal dans le métabolisme des xénobiotiques.

Ce rôle central est permis par sa position dans le corps humain mais aussi sa structure anatomique et physiologique particulière [55,56] (Figure 6). En effet, cet organe est l'un des plus vascularisés du corps humain. 30% du sang qui arrive dans le foie provient du cœur par l'artère hépatique et est enrichi en oxygène. 70 % du sang qui arrive dans le foie provient de la veine porte issue du système gastro intestinal et est riche en nutriments mais pauvre en oxygène.

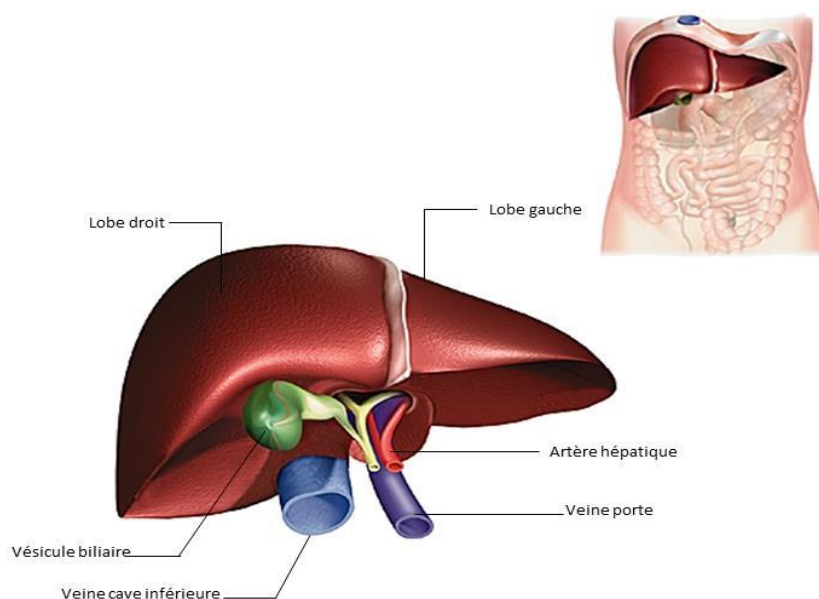


Figure 6 : Localisation anatomique et structure du foie. *D'après Mc Dowell, J. [56].*

Ce sang portal contient aussi les xénobiotiques ingérés et ayant franchi la barrière intestinale. Il y a donc une communication directe entre l'intestin et le foie par l'intermédiaire de la veine porte. Cette communication entraîne une limitation de la biodisponibilité des xénobiotiques empruntant cette voie. Ils seront en effet métabolisés par l'intestin et le foie avant d'être biodisponibles [53]. Cela constitue l'effet de premier passage intestinal et hépatique (Figure 7). Le produit du métabolisme des xénobiotiques par le foie peut aussi être excrété par l'intermédiaire de la bile via les canalicules biliaires des hépatocytes pour revenir à l'intestin puis au foie, etc. Ainsi se met en place un cycle appelé entéro hépatique (Figure 7).

Ce cycle entéro-hépatique pourra donc être à l'origine d'un effet de second passage limitant d'autant plus la biodisponibilité des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites.

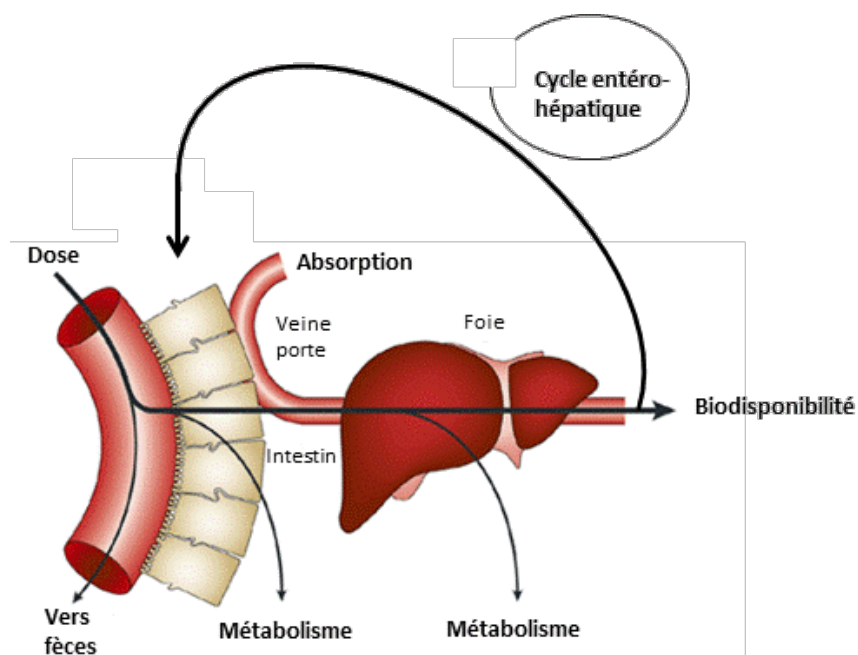


Figure 7 : Effets de premier passage intestinaux et hépatiques et cycle entéro-hépatique. D'après Van de Waterbeemd, H. and Gifford, E. [53].

D'un point de vue histologique, le foie est constitué d'une multitude d'unités structurales et fonctionnelles appelées lobules hépatiques. Ces lobules sont de forme hexagonales et traversés en leur centre par la veine centro-lobulaire. Ils sont délimités par une ramification de l'artère hépatique, de la voie biliaire et de la veine porte. Les lobules hépatiques sont constitués en grande majorité (60%) par les hépatocytes, devant les cholangiocytes qui constituent les canaux biliaires, les cellules endothéliales sinusoïdales, les cellules stellaires (réserve et réparation), les cellules de Kupffer (macrophages) et enfin les cellules à granulation (lymphocytes) [58]. Les hépatocytes représentent 80 % du poids du foie et sont des cellules de forme polyédrique. Ils sont hautement polarisés même si leur morphologie varie suivant la zone des lobules dans laquelle ils se situent [58]. Des sillons sont présents au niveau de leur membrane pariétale, ce qui permet la formation des canalicules biliaires par des hépatocytes adjacents. Ces canalicules permettent la circulation de la bile synthétisée et excrétée par les hépatocytes.

L'artère hépatique et la veine porte se rejoignent dans les sinusoïdes hépatiques. Les hépatocytes sont disposés en travée et irrigués par ces capillaires sinusoïdes qui vont ensuite

drainer les produits des hépatocytes vers la veine centro-lobulaire [59] (Figure 8). Le sang est alors renvoyé du foie vers la circulation systémique par l'intermédiaire des veines sus-hépatiques. La circulation sanguine se fait donc de la périphérie vers le centre des lobules hépatiques ce qui génère des gradients d'oxygène, de concentrations en nutriments, de xénobiotiques, etc. De même, la morphologie et la fonctionnalité des hépatocytes n'est pas la même entre la périphérie et le centre des lobules. Par exemple, l'expression de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques peut différer suivant ces différentes zones : le CYP3A4 est ainsi beaucoup plus exprimé au centre qu'à la périphérie des lobules. On parle alors de phénomène de zonation [58].

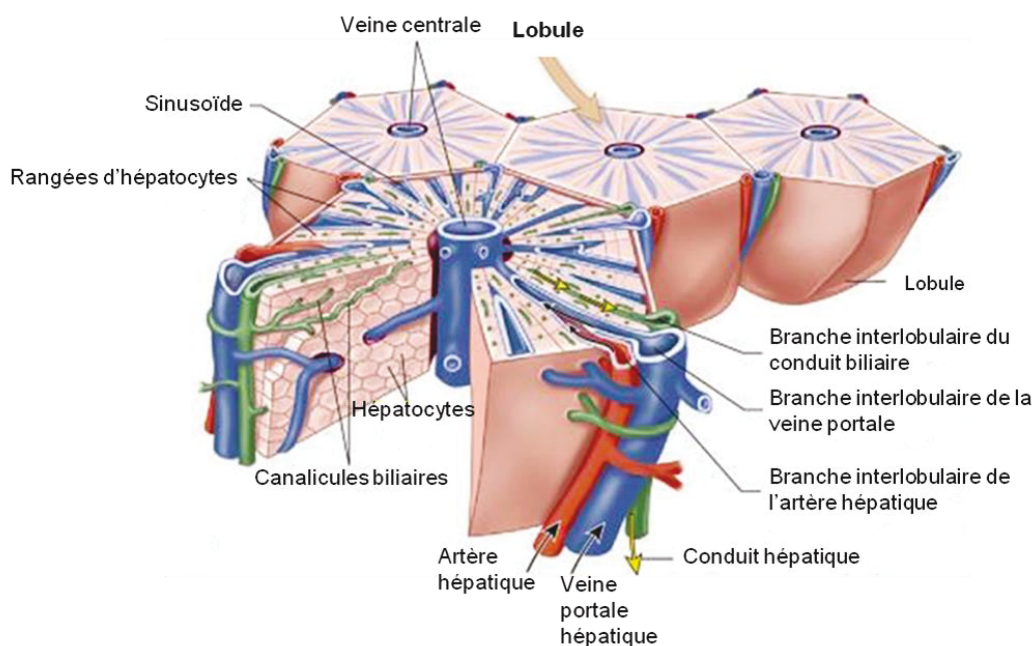


Figure 8 : Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire. La vue en coupe d'un lobule hépatique montre comment le sang en provenance de l'artère et de la veine portale hépatique circule entre les travées d'hépatocytes en direction de la veine centrale. Les cellules hépatiques produisent de la bile qui est dirigée par l'intermédiaire des canalicules biliaires vers les conduits biliaires. D'après Patton, K.T. and Thibodeau, G.A. [59].

Les hépatocytes assurent la plupart des fonctions du foie décrites ci-dessus comme en particulier le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques.

2.2. Absorption, métabolisme et excrétion hépatique

Les capacités métaboliques des hépatocytes sont très importantes. Ils expriment fortement la majorité des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques ainsi que la plupart des transporteurs permettant l'absorption ou l'excrétion des xénobiotiques (Tableau 1 et 2, Figure 9).

De la même façon que décrite dans la partie décrivant les processus d'ADME, l'absorption des xénobiotiques par les hépatocytes pourra se faire plus facilement pour les composés hydrophobes, aptes à traverser les membranes lipidiques des hépatocytes. De nombreux transporteurs permettent aussi l'influx et l'efflux des xénobiotiques ainsi que des substances endogènes dans les hépatocytes (Tableau 1, Figure 9). Le fonctionnement de ces transporteurs présents dans de nombreux tissus comme l'intestin et les reins a été décrit précédemment. Les transporteurs SLC dont les plus exprimés dans le foie appartiennent à la famille des OATP, vont permettre l'influx de nombreux xénobiotiques et substances endogènes comme les acides biliaires. Au contraire, les transporteurs ABC vont permettre l'efflux de ces xénobiotiques vers la bile ou la circulation sanguine (Tableau 1, Figure 9) [60]. Ce transport est déterminé par le poids moléculaire et plus généralement les propriétés physico chimiques de ces xénobiotiques. Les composés les plus lourds et polaires sont particulièrement excrétés par la bile. S'il y a excrétion des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites par les acides biliaires produits par le foie, ils pourront alors revenir à l'intestin et être définitivement éliminés par les fèces ou être redirigés vers le foie et subir de nouvelles étapes de métabolisme. Ce cycle entéro-hépatique a été décrit précédemment (Figure 7).

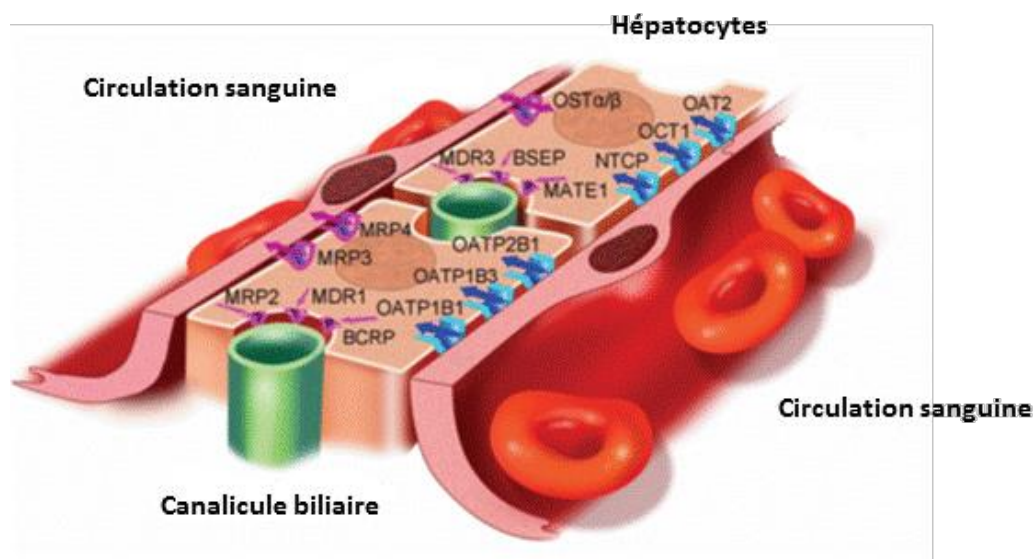


Figure 9 : Principaux transporteurs exprimés par les hépatocytes. Localisation et sens de ce transport. D'après Köck, K. and Brouwer, K.L.R. [60].

Une fois absorbés par les hépatocytes, les xénobiotiques pourront être pris en charge par les enzymes de phase I et II largement exprimés par ces cellules.

Les proportions des principaux CYPs exprimés par les hépatocytes sont connues : le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) [31]. Comme dans l'intestin, le CYP3A4 est largement prédominant quantitativement et en terme d'expression.

Les xénobiotiques ou leurs métabolites pourront aussi être conjugués à des composés endogènes par les enzymes de phase II exprimées par le foie. Ces enzymes sont similaires à celles retrouvées dans l'intestin, et contribuent à rendre les métabolites plus hydrophiles que les composés parents favorisant ainsi leur excrétion. En particulier, les uridine diphosphate glucuronosyl transférases, ou UGTs sont exprimées principalement dans le foie et vont faciliter la clairance des métabolites dans la bile et l'urine [26]. Les sulphotransférases (SULTs) principalement exprimées par les intestins et le foie vont également participer à ce processus d'excrétion [26].

Les xénobiotiques oraux sont donc majoritairement absorbés et potentiellement métabolisés par l'intestin avant d'atteindre le foie. De par sa position anatomique mais aussi de par les fortes capacités métaboliques des hépatocytes, le foie métabolise alors les

xénobiotiques absorbés avant de les renvoyer vers la circulation systémique ou de les éliminer par la bile et l'urine. Les xénobiotiques ingérés et hydrophobes subissent donc pour la plupart un effet de premier passage intestinal et hépatique qui joue un rôle de protection de l'organisme face à des xénobiotiques potentiellement toxiques. Ces effets de premiers passages sont particulièrement importants à prendre en compte car ils vont limiter la biodisponibilité de nombreuses molécules pharmaceutiques. Cet effet de premier passage peut être tellement important que certaines substances seront inefficaces après ingestion. Ceci peut être accentué par le phénomène de recirculation entéro-hépatique qui va imposer d'autres étapes de métabolisme par l'intestin et le foie aux xénobiotiques ou métabolites concernés. Ces deux organes jouent donc un rôle majeur dans la biodisponibilité de xénobiotiques comme les substances thérapeutiques. Comprendre et mimer le fonctionnement de ces deux organes est crucial pour comprendre les phénomènes aboutissant à la toxicité de xénobiotiques ou encore à la quantité de substances thérapeutiques pouvant atteindre leurs organes cibles après ingestion. Classiquement, ces études sont effectuées sur des modèles intestinaux et hépatiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

III. DE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE À L'UTILISATION DES MÉTHODES *IN VITRO* ALTERNATIVES: CONTEXTE ETHIQUE, REGLEMENTAIRE ET SCIENTIFIQUE.

La demande en nouvelles méthodes alternatives *in vitro* n'a cessé d'augmenter ces dernières années. Cet accroissement est lié à la conjugaison de nombreux facteurs comme le durcissement de la réglementation sur les expérimentations animales, la mise en place de règlements comme le règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals), les difficultés d'extrapolation à l'Homme des résultats obtenus après expérimentations animales ou encore le faible pouvoir prédictif des méthodes *in vitro* classiques. Pour bien comprendre la nécessité de développer des méthodes *in vitro* alternatives à l'expérimentation animale, il est nécessaire de commencer par resituer le cadre éthique et réglementaire dans lequel doit se placer toute expérimentation animale.

1. Cadre réglementaire et éthique de l'expérimentation animale

Il est communément admis que l'expérimentation animale est nécessaire pour tester des molécules et dispositifs ou effectuer des études de fonctionnement à l'échelle des organes et d'un organisme entier. Toutefois, la pression de l'opinion publique et la prise en compte de l'éthique expérimentale ont conduit à une demande accrue d'encadrement des tests sur animaux.

Cet encadrement éthique de l'expérimentation animale commence véritablement par la règle des 3R en 1959 [61] qui préconise à tous les expérimentateurs potentiels de :

- Réduire le nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations. Pour cela, le futur expérimentateur se voit, entre autres, dans l'obligation d'estimer le nombre d'animaux nécessaires à ces expérimentations tout en supprimant toutes celles potentiellement inutiles car déjà effectuées par d'autres équipes (directive n° 86/609/CEE) [62]. Il est aussi préconisé de partager les animaux tests entre expérimentateurs ayant des demandes compatibles.
- Raffiner les expérimentations, ce qui implique la prise en compte de la sensibilité de l'animal à la douleur lors des expérimentations. Les expérimentateurs doivent ainsi dans la mesure du possible diminuer les douleurs subies par les animaux ainsi que soulager leur

stress. On pourra, entre autres, souligner que l'expérimentateur a le devoir d'utiliser des méthodes non invasives si possible, d'utiliser des méthodes substitutives aux tests douloureux lorsqu'elles existent, d'utiliser les méthodes d'euthanasie appropriées etc. Afin de minimiser les douleurs subies par l'animal, la notion de point limite a été mise en place (Conseil canadien de protection des animaux). Ce point est défini comme étant le moment de l'expérimentation à partir duquel il est décidé de mettre fin à l'expérimentation par euthanasie ou par arrêt de l'expérience. Cela a plusieurs objectifs comme par exemple de mettre fin à des souffrances inutiles et de limiter les données incorrectes obtenues lorsque les animaux sont trop stressés.

➤ **Remplacer dès que possible l'expérimentation animale par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.** Les méthodes utilisées doivent bien sur avoir fait leur preuve et être préalablement validées.

Cette règle sert de base à toutes les lois et décrets publiés par la suite. A l'heure actuelle, l'harmonisation des lois entre les pays européens concernant l'éthique expérimentale a abouti à la mise en application de la directive européenne 2010/63 définissant le cadre dans lequel doivent se dérouler les expérimentations animales [63].

Ce décret impose l'application de la règle des 3R préalablement décrite, définit, entre autres, les domaines scientifiques pour lesquels sont autorisés l'expérimentation animale, précise les agréments et autorisation à acquérir avant de pouvoir pratiquer des expériences sur animaux et préconise aussi l'utilisation des méthodes alternatives dès que possible.

Ces décrets ont été renforcés dans certains secteurs comme celui de la cosmétique. On peut ainsi citer la directive européenne « Cosmétique » 7/768/CEE qui interdit à l'heure actuelle l'utilisation des animaux en vue des tests de cosmétique.

En France, c'est en 1976 que la première législation concernant l'expérimentation animale est mise au point. Cette loi a par ailleurs inspiré le Code Rural qui réglemente encore actuellement les pratiques utilisées en expérimentation animale [64]. Cette réglementation a été actualisée en février 2013 (articles R214-87 à R214-137 du code rural) et est à l'heure actuelle similaire à celle imposée par l'union Européenne. La règle des 3R y

sert là aussi de référence en termes de pratiques expérimentales. De plus, elle interdit par exemple l'utilisation des grands singes à des fins d'expérimentation sauf en cas de nécessité absolue comme lors des crises sanitaires. Les agréments sont donnés aux établissements pour une durée de 6 ans et tout projet de recherche nécessitant l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales devra faire l'objet d'une évaluation par un comité d'éthique. L'autorisation finale est donnée par le ministère de la recherche. On peut souligner que là aussi les méthodes de substitution à l'expérimentation animale sont conseillées.

La demande en méthodes alternatives a de plus été renforcée par la mise en place de règlement comme le règlement européen REACH n°1907/2006. Ce règlement a été promulgué le 18 décembre 2006 par l'Union Européenne et est entré en vigueur le 1^{er} juin 2007. Il impose un cadre réglementaire à l'utilisation des substances chimiques. Pour cela, les entreprises de l'agrochimie et toutes les industries annexes (plasturgie, textile, etc.) se voient dans l'obligation d'enregistrer toutes les substances chimiques anciennement et nouvellement commercialisées. De plus, ce règlement impose aux industriels d'évaluer les risques associés à l'utilisation de ces substances tout en préconisant dans ce but l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. En effet, en l'état actuel des pratiques expérimentales, les tests d'innocuité à effectuer sur les trente milles substances qui devraient être enregistrées d'ici 2018 impliqueraient l'utilisation d'environ 54 millions d'animaux. De plus, pratiquer tous ces tests de toxicité aurait un coût conséquent et nécessiterait des années d'études. En effet, pour seulement déterminer le potentiel cancérigène d'une molécule, il faut effectuer des tests pendant 2-3 ans pour un coût estimé de 3 à 7 millions d'euros [65]. Enfin, cette quantité de tests sur animaux est difficilement réalisable du fait du trop petit nombre d'infrastructures susceptibles de les effectuer et de la pression croissante de l'opinion publique ainsi que des associations de protection des animaux.

2. Contexte scientifique et opportunité économique au développement des méthodes alternatives

Cet encadrement sans cesse plus restrictif des pratiques expérimentales a eu par conséquent un impact sur des secteurs variés comme le secteur de la biologie fondamentale, pharmaceutique ou encore agrochimique dans leur phases de recherche, de

développement, de production et de contrôle qualité. En effet, ces secteurs sont fortement dépendants de l'utilisation d'un grand nombre d'animaux. A titre d'exemple, environ 12 millions d'animaux ont été utilisés en 2008 au sein de l'Union Européenne. Un petit nombre de ces méthodes alternatives est déjà validé par l'OCDE (organisation de coopération et de développement économiques) pour tester des paramètres comme l'absorption et l'irritation cutanée ou encore évaluer les effets mutagènes et génotoxiques de xénobiotiques. Aucune de ces méthodes validées ne propose toutefois de mimer le fonctionnement de l'intestin et du foie, deux organes pourtant majeurs pour déterminer la pharmacocinétique et la toxicité de nombreuses substances. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre de ces méthodes validées par des organismes comme l'OCDE afin de légitimer l'utilisation des résultats obtenus dans des dossiers juridiques par exemple.

2.1. Importance des modèles *in vitro* dans le développement pharmaceutique

Le secteur pharmaceutique constitue un marché prometteur pour le développement de méthodes alternatives innovantes. En effet, la mise au point d'une nouvelle substance pharmaceutique nécessite de longues années de développement et des investissements majeurs. La durée totale de développement est de l'ordre de 15 ans et entraîne des coûts parfois de l'ordre du milliard d'euros [66]. Ce développement est plus généralement divisé en deux grandes phases : la phase d'essai préclinique qui permet de sélectionner des molécules candidates et de les tester sur des modèles *in vitro* ainsi que chez l'animal et la phase d'essai clinique qui consiste aux tests des molécules sur l'Homme. Cette phase d'essai clinique est elle-même subdivisée en 3 phases. Lors de la phase I, les molécules candidates sont testées sur volontaires sains puis sur malades lors des phases II (à petite échelle) et III (à grande échelle). C'est seulement à l'issue de ces 3 phases que peut être accordée l'autorisation de mise sur le marché. Environ 30% des substances candidates qui ont été acceptées après des tests sur animaux lors des phases précliniques atteignent la phase III. Et de nouveau 30% de ces molécules sont rejetées à l'issue de cette phase III. Ainsi, sur des dizaines de milliers de molécules rentrant dans ce processus de développement, il arrive bien souvent que seulement quelques-unes soient commercialisables [67]. Ces échecs tardifs principalement dus à la découverte d'effets toxiques inconnus sont à l'origine d'un coût désastreux pour l'industrie pharmaceutique [68]. Déterminer plus rapidement ces toxicités

potentielles avec des modèles alternatifs ayant une bonne prédictibilité permettrait de diminuer le nombre de molécules testées dès les phases précliniques et de ne sélectionner que les meilleures candidates pour les phases cliniques plus coûteuses (plus de la moitié du coût global) [67,69]. Ces méthodes substitutives sont d'autant plus intéressantes que leurs durées d'utilisation sont plus courtes et leurs coûts moins élevés que ceux induits par le recours aux tests sur animaux [70].

2.2. Limites du modèle *in vivo*

Un autre argument en faveur du développement des méthodes alternatives est la difficulté d'extrapoler à l'Homme les résultats des études menées sur animaux [71]. En effet, même si de nombreuses études ont établi une correspondance entre résultats obtenus après expérimentation sur les animaux et l'Homme, il a été montré à plusieurs reprises une divergence notable [5]. On peut ainsi citer des différences entre certains mécanismes biologiques des rongeurs, représentant à eux seuls 80 % des animaux utilisés lors des expérimentations en 2008 selon un rapport de la commission européenne, et ceux observés chez l'humain. Par exemple, les effets de l'alimentation sur le vieillissement des souris sont difficilement extrapolables à l'Homme [72]. En terme de toxicité, les doses réponses observées entre les différents modèles animaux d'une part et l'Homme d'autre part peuvent grandement diverger [65]. On peut aussi noter des différences notables entre les différents modèles de rongeurs et humains concernant l'absorption de composés par voie cutanée [73,74]. De même, des études menées sur le rat montrent que même si la corrélation entre humains et rats est satisfaisante concernant les profils d'absorption intestinal des xénobiotiques [75], les divergences qu'il peut y avoir en terme de métabolisme intestinal et hépatique sont importantes [76]. Enfin, les doses testées sur l'animal sont bien souvent différentes des doses auxquelles l'Homme est exposé [71].

L'utilisation de méthodes alternatives prédictives auraient donc deux avantages principaux : réduire les coûts des expérimentations (notamment pour le développement de molécules pharmaceutiques) et répondre aux attentes en matière d'éthique animale [68]. Proposer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, à la fois fiables et utilisables par les industriels et chercheurs et permettant de mimer la fonctionnalité de l'intestin et du foie, représente donc à l'heure actuelle un enjeu stratégique et un marché dont le potentiel est colossal.

Ces méthodes alternatives peuvent être classées en 3 grandes catégories :

- Les méthodes *in vitro* qui reposent sur l'utilisation de matériel biologique comme des tissus, des cellules ou encore des organites.
- Les méthodes *ex vivo* reposent sur l'utilisation d'éléments biologiques prélevés *in vivo*, et sont donc mises en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés et non s'y substituer.
- Les méthodes *in silico* sont des modèles mathématiques simulant le fonctionnement de cellules, tissus, organes ou encore organisme et s'appuient bien souvent sur les données expérimentales obtenues *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo*.

IV. DESCRIPTION DES MÉTHODES ALTERNATIVES CLASSIQUES

Un certain nombre de modèles alternatifs à l'expérimentation animale sont classiquement utilisés pour mimer le fonctionnement de l'intestin et du foie. Ces modèles présentent chacun des avantages et inconvénients bien spécifiques en comparaison avec le modèle *in vivo* (Tableau 3).

	<i>In Silico</i>	<i>Ex Vivo</i>	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>
Caractéristiques	Ces modèles se basent sur la relation structure/activité des xénobiotiques (QSAR) ou sur les données de clairance propre à chaque organe (PBPK).	Fragments d'organes issus du modèle animal (principalement) ou humain.	Culture de cellules ou de fragments cellulaires.	Les expérimentations sont principalement effectuées à l'aide de modèles animaux comme les rats (modèle principalement utilisé), chiens et porcs.
Avantages	Ces modèles sont rapides d'utilisation et peu coûteux.	Ces modèles retranscrivent en partie la complexité du vivant et permettent d'étudier les paramètres ADME d'un organe en particulier. La quantité de matériel nécessaire est moins importante que lors des expérimentations pratiquées <i>in vivo</i> .	Ces modèles sont moins coûteux que les autres. Ils permettent de suivre le fonctionnement d'une population cellulaire donnée et d'éviter des problèmes éthiques propres à l'utilisation d'animaux.	Ces modèles retranscrivent toute la complexité du vivant et permettent d'obtenir des données prenant en compte des facteurs comme la distribution sanguine des xénobiotiques, les phénomènes de zonation et plus généralement tous les facteurs pouvant influencer l'ADME des xénobiotiques.
Inconvénients	Il y a un manque de bases de données fiables. Les résultats obtenus ne sont pas aussi prédictifs que ceux obtenus après des expériences <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .	Les explants sont issus principalement des modèles animaux, faible viabilité des tissus.	Ce modèle ne retranscrit pas la complexité du vivant et la physiologie d'organisme entier. Les résultats obtenus avec ce modèle varient d'un laboratoire à un autre. Les cellules primaires ont une fonctionnalité plus proche de celle retrouvée <i>in vivo</i> mais qui décroît au cours du temps. Les cellules de lignée sont plus stables et robustes mais ont une activité plus éloignée de celle des populations cellulaires <i>in vivo</i> .	Limitations éthiques. Grande quantité de matériel nécessaire. Difficulté d'étudier le fonctionnement et les mécanismes impliquant un seul organe ou type cellulaire. Difficulté d'extrapolation des résultats obtenus de l'animal à l'Homme. Un organe permet de tester l'ADME de quelques xénobiotiques.

Tableau 3 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des principaux modèles permettant d'étudier le métabolisme et la toxicité des xénobiotiques oraux. D'après Antunes, F. et al., Fasinu, P. et al. [77–80]

1. Méthodes *ex vivo*

Ces méthodes reposent sur l'extraction d'organes entiers ou de fragments d'organes hors du corps de l'animal ou de l'Homme. Ces techniques permettent donc de conserver la complexité des organes et le niveau de différenciation des types cellulaires les composant. L'utilisation de ces méthodes est donc particulièrement intéressante notamment dans le cadre des études des paramètres d'ADME de substances pharmaceutiques et de xénobiotiques. Les tissus sont maintenus en vie par l'intermédiaire d'une perfusion ou d'une culture statique pendant toute la durée des expérimentations. Toutefois, ces méthodes de

culture aboutissent à la dégradation rapide de l'intégrité et de la fonctionnalité des tissus ce qui n'autorise pas la mise en place d'expérimentations sur un moyen et long terme. Ce dernier point constitue la limitation majeure de ces méthodes de culture *ex vivo*. Un autre défaut consiste en la difficulté d'obtention de fragments issus de l'Homme. L'utilisation prioritaire d'animaux entraîne alors une mauvaise prédictibilité des résultats obtenus.

1.1. Modèles *ex vivo* intestinaux

Ces modèles consistent en la culture de fragments intestinaux. L'utilisation de ce type de modèles permet de conserver en grande partie la fonctionnalité intestinale même si les tissus utilisés ne sont pas innervés et vascularisés, ce qui représente une limitation par rapport aux modèles *in vivo*. Il a été montré que ces tissus conservaient une bonne activité métabolique ce qui rend ce modèle pertinent dans un objectif de tests d'absorption et de métabolisme des xénobiotiques [81,82]. De même que pour les méthodes *in vivo*, les portions d'intestin utilisées proviennent la plupart du temps de l'animal ce qui limite l'extrapolation des résultats à l'Homme (Tableau 3) [77]. L'inconvénient principal de ces méthodes est la dégradation rapide de la fonctionnalité des fragments intestinaux même si ils peuvent être utilisés pendant un temps supérieur à 4 heures [82]. Les plus classiquement utilisés sont les sacs intestinaux éversés, les segments intestinaux isolés et les chambres de Ussing [83].

i. Sacs intestinaux éversés

Pour fabriquer des sacs intestinaux éversés, l'intestin des animaux est prélevé puis retourné. L'intégrité des sacs obtenus peut être maintenue jusqu'à plus de deux heures après prélèvement en les plongeant dans une solution saline et oxygénée. Cette solution peut aussi contenir les xénobiotiques d'études [84]. Cette méthode présente de nombreux avantages. Elle permet de suivre l'effet de premier passage intestinal subi par les xénobiotiques et l'activité de transporteurs comme la Pgp [85]. Toutefois, la couche musculieuse intestinale est toujours présente ce qui peut entraîner l'absorption des xénobiotiques testés dans des conditions non physiologiques. L'éversion peut également entraîner une diminution de l'intégrité de la barrière intestinale [84].

ii. Segments intestinaux isolés

Des fragments d'intestin isolés et perfusés peuvent aussi être utilisés pour tester l'absorption et le métabolisme de composés [83,86]. Ce modèle organotypique présente de nombreux avantages. Ainsi, il est possible de produire rapidement et d'utiliser un grand nombre de fragments à partir d'une seule portion d'intestin. Ces fragments possèdent une fonctionnalité proche de celle de l'intestin initial [82,84,87]. Les résultats obtenus sont considérés comme proche de ceux obtenus *in vivo* et l'utilisation de cette technique est associée à une bonne répétabilité des expériences [83]. Là aussi, le défaut principal de cette méthode est la dégradation rapide de la fonctionnalité des segments lors des expérimentations.

iii. Chambre de Hussing

La culture de fragments intestinaux peut aussi être réalisée au sein de chambre de Hussing [88]. Les fragments vont alors délimiter deux compartiments ce qui permet de suivre l'absorption et le métabolisme de xénobiotiques [89]. La couche musculaire de fragments est préalablement enlevée et la viabilité du tissu est suivie par mesure de la résistance transépithéliale du tissu à l'aide d'électrodes [90]. Là aussi, la problématique est la conservation des tissus sur une longue durée. En effet, les tissus sont classiquement conservés dans ces chambres pendant un peu plus de deux heures [81] mais une dégradation du tissu est observable dès 20 minutes après le début de l'expérimentation [91].

1.2. Modèles *ex vivo* hépatiques

Les méthodes *ex vivo* classiquement utilisées pour étudier la fonctionnalité hépatique reposent principalement sur l'utilisation de foies isolés et perfusés ou encore sur la culture de fragments hépatiques [80].

i. Foies isolés et perfusés

Dans ce cas, les foies sont extraits de l'animal et perfusés après extraction [92]. Ce modèle est sans aucun doute un de ceux qui permet de retranscrire au mieux les conditions du foie *in vivo*. Les hépatocytes possèdent toujours leurs phénotypes initiaux. Ce modèle permet aussi de conserver la complexité originelle de l'organe, comme la présence des différents types cellulaires, et de structures physiologiques comme les canalicules biliaires [93]. Cette méthode permet donc de suivre le métabolisme et l'efflux des xénobiotiques

dans des conditions proches de l'*in vivo*. Toutefois, de nombreux défauts vont grandement limiter l'utilisation de cette méthode. Ainsi, la viabilité des tissus du foie isolé ne dépasse pas 3 heures et se dégrade très rapidement hors du corps de l'animal par manque d'oxygénation et d'apports en nutriments. De plus, le modèle animal est privilégié et les résultats obtenus sont peu répétables [78,80].

ii. Fragments hépatiques

Là aussi, mais dans une moindre mesure que pour les foies isolés et perfusés, l'utilisation de cette méthode *in vivo* permet de conserver une partie de la complexité et de l'organisation du foie initial. Toutefois, la circulation portale ou encore la production de bile ne peut être étudiée [78]. Cette technique permet cependant de conserver les structures morphologiques hépatiques et l'expression des enzymes des hépatocytes qui diffère suivant les zones des fragments [94]. Cela en fait un bon modèle pour les études de toxicité et du métabolisme des xénobiotiques. Grâce à l'amélioration de la technique de prélèvement des fragments hépatiques, il est possible d'obtenir des fragments très fins (<250 µm d'épaisseur) ce qui favorise la diffusion de l'oxygène et des nutriments [95]. Il est ainsi possible de maintenir la fonctionnalité de ces fragments pendant une période de 2-3 jours, une durée supérieure à celle obtenue avec les foies isolés et perfusés mais qui reste courte. Enfin, l'obtention de tissus humains reste compliquée mais l'utilisation de biopsies et de résections opératoires rend ce modèle plus accessible que l'utilisation de foies isolés et perfusés. Toutefois, cette méthode reste limitée par la dégradation rapide des propriétés des fragments, la nécrose des tissus intervenant dès 48 heures de culture [96,97].

Ces modèles *ex vivo* sont donc adaptés pour suivre l'effet de premier passage intestinal ou la fonctionnalité hépatique sur des temps courts d'expérimentation. Toutefois, la dégradation de la viabilité et la modification rapide des capacités métaboliques et des tissus cultivés limitent l'utilisation de ces méthodes.

2. Méthodes *in vitro* cellulaires

Ces méthodes présentent de nombreux avantages notamment en termes d'éthique et de facilité d'utilisation (Tableau 3). De plus, elles permettent de cibler les effets des xénobiotiques sur une population cellulaire donnée et sont bien souvent moins coûteuses à mettre en place que les tests *in vivo* et *in situ* [98]. Toutefois, elles ne retranscrivent pas

toute la complexité des conditions *in vivo* comme l'environnement physiologique, l'organisation propre des organes mimés ou encore les interactions entre organes. De plus, les résultats obtenus sur un même modèle *in vitro* peuvent grandement varier d'un laboratoire à un autre.

Chaque méthode *in vitro* possède ses propres avantages et inconvénients que nous décrirons par la suite et bien souvent, la stratégie d'étude consiste à combiner plusieurs de ces méthodes afin d'obtenir les résultats les plus fiables possibles et extrapolables à l'Homme [99]. Certains modèles non cellulaires sont utilisables. Il est possible d'utiliser des organites ou des fragments de cellules comme les vésicules membranaires intestinales [99] ou les microsomes hépatiques [80]. Il est aussi possible d'utiliser des modèles artificiels comme des bicouches lipidiques [100] ou des membranes artificielles [101]. Toutefois, ces méthodes ne retranscrivent pas la complexité cellulaire par manque de l'activité d'enzymes et de transporteurs. Elles sont donc adaptées au suivi de l'absorption et du passage des xénobiotiques à travers une barrière ou au suivi de leur métabolisme par certaines structures hépatiques mais ne retranscrivent pas les conditions *in vivo* [80]. Les modèles cellulaires permettent de se rapprocher des conditions *in vivo* et reposent principalement sur l'utilisation de cellules primaires issues directement des organes ciblés ou de cellules issues de lignées. Nous décrivons ici les méthodes *in vitro* les plus couramment utilisées.

2.1. Modèles *in vitro* cellulaires intestinaux

i. Entérocytes primaires

Les entérocytes représentent 90% de la population cellulaire intestinale. Toutefois, lorsqu'ils sont isolés et cultivés en monocouche, ils ne différencient pas un pôle apical et basal bien défini, ce qui limite grandement l'étude du transport de xénobiotiques à travers la barrière intestinale [102]. De plus, ces cellules sont particulièrement sensibles aux conditions de culture et la variabilité, entre les laboratoires, des résultats obtenus est particulièrement importante [77]. Enfin, la fonctionnalité et l'intégrité des entérocytes isolés diminuent rapidement au cours du temps de culture.

ii. Lignées cellulaires

Du fait des limitations liées à l'utilisation des entérocytes primaires en culture, l'utilisation de lignées cellulaires peut être une bonne alternative. Ces lignées peuvent être,

entre autres, issues d'adénocarcinomes intestinaux humains comme les Caco-2, les HT29 ou de lignées animales comme MDCK et 2/4/A1. Les avantages de l'utilisation de ces cellules immortalisées consistent en leur capacité à proliférer rapidement, à se différencier en monocouches polarisées possédant des propriétés similaires à celles de la barrière intestinale et à être cultivables sur un long terme.

Il est ainsi possible de cultiver la lignée cellulaire MDCK (Madin-Darby canine kidney) sur des membranes semi perméables. Ces cellules se différencient alors en cellules épithéliales étroitement jointes par l'intermédiaire de jonctions serrées. Cette barrière montre des similarités avec la barrière intestinale *in vivo* et peut être utilisée pour suivre l'absorption et le transport de xénobiotiques. Il a été montré que l'utilisation de ce modèle pouvait permettre d'obtenir des résultats corrélés à ceux que l'on retrouve *in vivo* [103]. La perméabilité de ce type cellulaire est d'ailleurs semblable à celle d'une autre lignée que nous décrirons plus en détail par la suite : les Caco-2 [103]. Un des avantages principal de l'utilisation de ce type cellulaire est la rapidité à laquelle la barrière épithéliale se met en place. Elle est ainsi de 3 jours pour les MDCK contre 3 semaines pour les Caco-2 [77]. Le flux de xénobiotiques hydrophiles est plus rapide à travers les monocouches de MDCK que celles formées par les Caco-2. Cela se traduit par une plus petite résistance transépithéliale (TEER) de la barrière formée par la culture de MDCK [77]. Cette TEER mesurée est plus proche de celle du petit intestin que celle mesurée en utilisant des Caco-2. Le principal désavantage de l'utilisation de ce type cellulaire est qu'il est issu de l'animal et non de l'Homme comme c'est le cas des Caco-2. Cela se traduit par une activité métabolique réduite et une expression de transporteurs plus faible dans le cas des MDCK comparées à celles des Caco-2. Leur utilisation s'avère donc limitée dans l'étude du rôle que peut jouer un transporteur d'efflux comme la Pgp sur l'absorption de xénobiotiques [77].

Les cellules 2/4/A1 ont initialement été isolées d'intestin de fœtus de rat et se différencient en monocouche présentant de nombreuses similarités avec le petit intestin particulièrement dans le cadre de l'étude du transport des substances thérapeutiques [99]. De la même manière que les Caco-2, elles se différencient en monocouches différenciées présentant des microvillosités, des jonctions serrées et expriment de nombreux

transporteurs. La résistance transépithéliale mesurée après différenciation de ce type cellulaire en monocouche est bien plus similaire à ce que l'on retrouve *in vivo* au niveau du petit intestin que celle mesurée en utilisant des Caco-2 [99,104]. Toutefois, l'origine animale de ce type cellulaire représente une sérieuse limitation.

Les cellules HT29 sont issues d'un adénocarcinome humain. Ces cellules expriment des caractéristiques modérées des entérocytes différenciés et différencient des jonctions serrées plus perméables que celles des Caco-2 classiques. Les cellules de cette lignée peuvent aussi se différencier en cellules produisant du mucus excrété en apical de la barrière intestinale [77,105]. Cela constitue l'avantage majeur de cette lignée qui permet ainsi de reproduire certaines des conditions physiologiques propres à la barrière intestinale. Ainsi, il est possible d'obtenir 50% de cellules de la population totale de HT29 qui produisent des mucines lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu dépourvu de sérum [106]. Toutefois, contrairement aux Caco-2, elles n'expriment pas la Pgp [105,107]. Elles peuvent être co-cultivées avec les Caco-2, ce qui permet de combiner les avantages de ces deux types cellulaires [108,109].

Les Caco-2 ont initialement été isolées d'un adénocarcinome humain. La culture de cette lignée constitue le modèle *in vitro* intestinal le plus utilisé et le plus étudié pour l'étude de l'absorption et du transport des xénobiotiques [110]. Les Caco-2 atteignent la confluence en 3 à 6 jours et la phase stationnaire après 10 jours de culture. Lorsqu'elles sont cultivées pendant 21 jours sur des membranes semi-perméables et poreuses, elles développent des caractéristiques similaires à celles des entérocytes. Les cellules expriment alors un haut niveau de phosphatase alcaline, de sucrase isomaltase et d'aminopeptidase. Ces cellules expriment aussi des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et des transporteurs. Il s'agit plus particulièrement des CYPs comme les CYP1, des enzymes de phase II de type glucotransférase et sulfotransférase ou encore des transporteurs comme la Pgp [83,111]. En terme morphologique, elles différencient des bordures en brosse et des jonctions serrées, formant ainsi une monocouche polarisée [89,112]. Toutefois, l'utilisation de ce type cellulaire présente certains inconvénients. Il n'exprime pas ou très peu le CYP3A qui est pourtant le CYP intestinal le plus exprimé *in vivo*, il ne produit pas de mucus et l'activité de

transporteurs comme la P-gp est différente de celle que l'on retrouve *in vivo* [83,89,113,114]. De plus, la perméabilité des jonctions formées par les Caco-2 est beaucoup plus faible que celle du petit intestin *in vivo* [89] et les mesures de perméabilité et de TEER peuvent varier sensiblement d'un laboratoire à un autre selon les conditions de culture [115].

Un certain nombre de sous clones des Caco-2 peuvent être utilisés, en particulier les Caco-2 TC7 dont l'utilisation présente de nombreux avantages. Ce sous clone est morphologiquement similaire aux Caco-2. Ainsi ces cellules se différencient en barrière polarisée présentant une bordure en brosse, des microvillosités et des jonctions serrées [116]. Ces cellules sont plus homogènes en terme de taille que les Caco-2 parentales et se multiplient rapidement ce qui les conduit à former une barrière intègre avant les Caco-2. Ainsi, la population cellulaire double en 26 heures pour les TC7 contre 30 heures pour les Caco-2 classiques [116]. Le passage paracellulaire à travers la barrière formée par les TC7 différenciées est plus important que pour les Caco-2 parentales ce qui se traduit par une diminution de la TEER mesurée pour les TC7 [117]. Cette TEER trop élevée par rapport aux conditions *in vivo* représentait une limitation à l'utilisation des Caco-2 parentales. Paradoxalement, d'autres publications rapportent une TEER plus importante pour les TC7 que les Caco-2 parentales [116]. Les résultats de TEER que nous avons mesurés après culture des TC7 dans le cadre de cette étude correspondaient toutefois à ceux rapportés par l'équipe de Ranaldi, G. *et al.* [117]. De nombreux avantages en font un modèle particulièrement intéressant à utiliser. En particulier, elles expriment plus le CYP3A en termes de quantité d'ARNm et de protéines que les Caco-2 parentales, un CYP particulièrement exprimé dans l'intestin. Il pourrait s'agir dans le cas des TC7, du CYP3A5 plus exprimé dans le colon que dans le petit intestin mais qui partage de nombreux substrats avec le CYP3A4 [118,119]. Au contraire, elles expriment peu le CYP1A1 comparativement aux Caco-2. Enfin, l'expression d'enzymes de phase II comme les UDP glucuronyltransférases par les TC7 est plus importante que celle des Caco-2 parentales [116]. Cette lignée cellulaire présente donc les atouts des Caco-2 parentales mais aussi des avantages comme l'expression des CYP3A (Tableau 4).

Lignée cellulaire	Avantages	Inconvénients
MDCK	Différenciation rapide. Facilité d'utilisation. Permet de suivre le transport passif des composés à travers la barrière intestinale.	Origine animale. N'est pas issue de cellules intestinales. N'exprime pas la Pgp.
2/4/A1	Différenciation rapide. Perméabilité plus proche de celle du petit intestin que celle des Caco-2.	Origine animale. Appropriée principalement pour suivre le transport passif de xénobiotiques.
HT29	Permet la différenciation de cellules productrices de mucus	N'exprime pas la Pgp. Appropriée principalement pour suivre le transport passif des xénobiotiques.
Caco-2	Lignée intestinale la plus utilisée et caractérisée. Exprime de nombreux transporteurs d'influx et d'efflux. Permet de suivre le transport actif et passif des xénobiotiques. Origine humaine. Peut être utilisée dans les études d'ADME de xénobiotiques.	Perméabilité et expression de la Pgp différente de celle du petit intestin <i>in vivo</i> . Variabilité des résultats obtenus avec cette lignée entre les laboratoires. N'exprime pas le CYP3A
Caco-2 TC7	Possède les avantages des Caco-2. Exprime le CYP3A. Croissance plus rapide que celle des Caco-2. Population plus homogène que les Caco-2. Meilleure répétabilité des résultats que ceux obtenus avec les Caco-2. Expression de nombreuses enzymes de phase II.	Perméabilité et expression de la Pgp différente de celle du petit intestin <i>in vivo</i> . N'exprime pas ou peu le CYP1.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des lignées cellulaires intestinales les plus utilisées pour suivre le transport des xénobiotiques. D'après Sips AJAM, V.C., Balimane, P.V. and Chong, S. [89,120].

2.2. Modèles *in vitro* cellulaires hépatiques

i. Hépatocytes primaires

L'obtention d'hépatocytes primaires d'origine humaine est devenue plus facile ces dernières années du fait de l'amélioration des techniques de cryopréservation [121]. Il est possible de cultiver ces cellules directement en suspension. Toutefois, l'activité et la viabilité des hépatocytes se dégradent rapidement dans ces conditions [78].

Traditionnellement, elles sont cultivées en monocouches dans des plaques de Pétri. Ce modèle constitue le modèle de référence pour la culture *in vitro* hépatique. Dans ces conditions, ces cellules conservent de nombreuses caractéristiques des hépatocytes *in vivo* pour des périodes allant jusqu'à 72 heures de culture. Elles présentent pendant cette période une bonne activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dont l'hétérogénéité des expressions reflète bien les conditions *in vivo* [122]. Elles sont alors particulièrement intéressantes pour l'étude de l'absorption, du métabolisme et de l'excrétion des xénobiotiques. Toutefois, après cette période, un mécanisme de dédifférenciation est observable avec une diminution de l'activité de nombreuses enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques [123]. Cette dédifférenciation s'accompagne également d'une perte de la polarisation des cellules et des fonctions hépatocytaires et constitue le principal défaut de cette méthode de culture [124,125]. Enfin, un autre défaut est la mauvaise répétabilité des expérimentations avec ce modèle due à la grande hétérogénéité d'activité et de fonctionnalité de ces cellules selon le donneur initial [80].

Pour pallier à ces défauts, il est possible d'utiliser des cellules immortalisées ou prolifératives car dérivées de tumeur.

ii. Lignées cellulaires

Les plus utilisées sont appelées Fa2N-4, HepG2, Hep3B, PLC/PRFs Huh7, HBG, et HepaRG [79]. Ces lignées conservent des caractéristiques propres aux hépatocytes mais présentent un manque ou une expression très faible des enzymes métaboliques [126]. Leur utilisation permet d'obtenir une bien meilleure reproductibilité des résultats que ceux obtenus après utilisation des hépatocytes primaires [127]. L'utilisation de ces types cellulaires est donc limitée pour les études de métabolisme et d'excrétion des xénobiotiques mais s'avère intéressante pour une première étude du fonctionnement de dispositifs *in vitro* comme celui qui fait l'objet de cette étude. Nous décrivons plus en détail les lignées HepaRG et HepG2 qui constituent de bonnes alternatives à l'utilisation des hépatocytes primaires humains.

La lignée des HepaRG est issue d'un adénocarcinome et présente des caractéristiques similaires aux hépatocytes après une étape de différenciation par exposition à du DMSO. Les

cellules de cette lignée présentent des caractéristiques propres aux hépatocytes et cellules biliaires [127]. Elles expriment de nombreuses enzymes du métabolisme des xénobiotiques et transporteurs à un niveau bien plus élevé que les Huh 7 ou encore les HepG2 [128]. Cette lignée représente donc une bonne alternative à l'utilisation des hépatocytes primaires humains puisqu'elle conserve une bonne activité enzymatique tout en possédant les capacités prolifératives des lignées [129]. Toutefois, la durée de culture et la nécessité d'utiliser du DMSO pour obtenir des cellules différenciées représentent des défauts propre à cette lignée.

La lignée des HepG2 est issue d'un hépatoblastome et conserve une inductibilité de certains enzymes du métabolisme des xénobiotiques, en particulier les CYPs. Cependant, le défaut majeur de cette lignée est sans aucun doute la très faible expression basale des enzymes de phase I de ces cellules, ce qui en fait un modèle peu approprié aux études de pharmacocinétique [130]. Elles sont toutefois intéressantes à utiliser du fait de leur stabilité métabolique qui permet une bonne reproductibilité des résultats et une culture à long terme [131]. Un des sous clones de cette lignée possède, de plus, des propriétés intéressantes comme sa production d'albumine élevée qui peut donc être utilisée pour suivre la fonctionnalité des cellules [132]. Il s'agit des HepG2 C3A que nous avons utilisées dans cette étude pour déterminer la faisabilité du dispositif *in vitro* innovant constituant le sujet de ce manuscrit.

2.3. Méthodes *in silico*

Ces dernières années ont vu le développement de l'utilisation des méthodes *in silico* pour prédire l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité des xénobiotiques. Ces méthodes qui ne nécessitent pas la mise en place d'expérimentations mais reposent sur les données obtenus *in vivo* et *in vitro* sont très peu coûteuses. Le développement de ces méthodes constitue donc un enjeu stratégique en particulier pour l'industrie pharmaceutique pour laquelle les coûts de conception et développement de médicaments sont énormes. Ces coûts élevés sont bien souvent dûs à la mauvaise estimation des propriétés d'ADME des molécules candidates à des stades avancés du développement pharmaceutique [133]. L'utilisation de modèles *in silico* performants permet de procéder à un premier filtre sur les molécules candidates à tester en prédisant leurs

propriétés d'ADME. De même, l'utilisation de ces modèles contribue à répondre aux attentes en termes de gestion du risque chimique et à diminuer le nombre d'animaux utilisés pour prédire la toxicité de xénobiotiques.

Des modèles capables de prédire les propriétés d'ADME de molécules sont toutefois particulièrement complexes à mettre en place. En effet, ces propriétés dépendent d'une multitude de paramètres parfois inconnus comme, entre autres, les propriétés physicochimiques des xénobiotiques testés et celles des barrières biologiques, l'expression et l'activité des EMX des tissus cibles, et bien d'autres... Nous décrirons deux de ces modèles particulièrement utilisés pour prédire les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion suite à une exposition à des xénobiotiques ainsi que leurs toxicités potentielles : les modèles QSAR (Quantitative structure-activity relationship) et PBPK (Physiologically based pharmacokinetic).

Les modèles les plus couramment utilisés pour prédire les propriétés d'ADME des molécules sont basés sur des approches empiriques comme c'est le cas des modèles QSAR (Quantitative structure-activity relationship). Comme leur nom l'indique, ces modèles se fondent sur le lien qu'il peut y avoir entre les propriétés chimiques des xénobiotiques d'intérêt et leurs effets biologiques. Le postulat de base est donc que des molécules ayant des propriétés chimiques similaires auront des effets biologiques semblables. Par exemple, le modèle proposé par Clark [134] sépare les xénobiotiques en deux catégories suivant leurs propriétés de surface : les xénobiotiques peu et largement absorbés par l'intestin. La construction de ces modèles implique donc de disposer d'un grand nombre de données permettant de faire le lien entre la structure des xénobiotiques et l'activité biologique des xénobiotiques. Moins ces données seront précises moins les prédictions des propriétés ADME des xénobiotiques seront fiables. Ce point constitue donc un des désavantages majeur de l'utilisation de ce type de modèles.

Les modèles PBPK (pharmacocinétique et physiologiques) se basent sur une vision compartimentée du corps humain. Chaque organe est représenté par un compartiment dont les paramètres d'ADME sont décrits par des fonctions mathématiques de type équations différentielles. Ces équations permettent ainsi de modéliser les débits sanguins, le volume et les capacités métaboliques de chaque organe et reposent sur des principes physiques

comme la dynamique des fluides, la perméabilité des membranes cellulaires... La liaison entre chacun de ces organes est décrite par des équations modélisant les connexions vasculaires ou lymphatiques physiologiques. Ces modèles permettent donc de décrire la quantité de xénobiotiques résiduels et donc leur biodisponibilité à la sortie d'un organe ou d'un groupement d'organes. Cela permet d'ajuster ces modèles en continu par l'ajout ou l'amélioration des compartiments décrivant le fonctionnement de chacun des organes.

L'utilisation de ces modèles peut donc constituer un premier filtre à la sélection de molécules thérapeutiques candidates. Elle peut aussi permettre de prédire un certain nombre de paramètres ADME suivant les propriétés physicochimiques des molécules (modèles QSAR) et les concentrations des xénobiotiques dans les différents compartiments du corps humain (modèles PBPK). Toutefois, ces modèles présentent aussi des désavantages. En effet, ils se basent sur des données obtenues à partir d'expériences *in vitro*, *vivo* et *ex vivo* et leur fiabilité va donc être directement liée à la qualité de ces données. De plus, ces modèles ne rendent pas compte de la variabilité individuelle qui peut être très forte et induire des paramètres ADME différents d'un individu à l'autre.

Nous avons donc décrit les différentes méthodes alternatives aux méthodes *in vivo*. Toutefois, leur nombre reste limité par rapport aux besoins et l'extrapolation à l'*in vivo* des résultats obtenus avec ces méthodes reste difficile [135]. En effet, les méthodes *in vitro* classiques, qui reposent la plupart du temps sur la culture simple de cellules isolées en boîte de Pétri, ne permettent pas de retranscrire toute la complexité du vivant et les interactions entre organes, paramètres qui peuvent être déterminants dans les phénomènes de toxicité [136].

V. NOUVELLES MÉTHODES ALTERNATIVES

Les méthodes *ex vivo* et *in vitro* classiques présentent des avantages comme leur facilité d'utilisation et leur coût mais peinent à retranscrire le microenvironnement des organes *in vivo* ou à maintenir la viabilité et la fonctionnalité des tissus et cellules cultivés.

Pour pallier à ce défaut et obtenir des résultats les plus fiables possibles, un certain nombre de nouvelles méthodes ont été mises au point. Ces méthodes vont permettre notamment de cultiver les tissus ou cellules dans des environnements bien spécifiques : en 3 dimensions, en perfusion, etc. Ces conditions de culture vont améliorer, entre autres, la viabilité et la fonctionnalité des tissus et cellules cultivés comme par exemple l'activité des EMX des lignées cellulaires [11]. Leur utilisation permet aussi de conserver la fonctionnalité des cellules primaires sur un plus long temps de culture et donc leur capacité à métaboliser les xénobiotiques sur un long terme [12].

La culture des cellules ou tissus dans un milieu dynamique va jouer un grand rôle dans la conservation de leur viabilité et de leur fonctionnalité. En effet, cette perfusion va permettre de renouveler en continu les nutriments consommés par les cellules et tissus cultivés tout en éliminant les déchets produits. De plus, ce flux pourra exercer une contrainte mécanique sur les tissus et cellules cultivés aboutissant à une réorganisation de leur morphologie et une modification de leurs fonctionnalités [11,137].

L'une de ces méthodes alternatives repose sur l'utilisation de microsystèmes. Ces microsystèmes sont fabriqués bien souvent par lithographie. Cette technique permet d'obtenir des structures microfluidiques composées de microcanaux permettant la culture dynamique de cellules sur une matrice extracellulaire type collagène, fibronectine... Les microsystèmes constituent ainsi une méthode de culture cellulaire particulièrement intéressante car elle permet une nette diminution des volumes dans lesquels sont cultivées les cellules, d'augmenter le ratio volume surface et d'étudier des écoulements à l'échelle micrométrique. Cette culture à l'échelle micrométrique permet de contrôler le microenvironnement cellulaire pour simuler les conditions *in vivo* [138,139]. Il est ainsi possible de stimuler les cellules par des modifications de leur environnement chimique (ajout de facteurs de transcription par exemple) ou mécanique (induction d'un cisaillement

par flux par exemple) [138]. Les cellules cultivées à l'intérieur des microsystèmes pourront ainsi s'organiser en 3 dimensions dans des configurations plus semblables à celle des organes dont elles sont issues [139]. Elles conserveront aussi plus longtemps leur activité et leurs fonctionnalités. Ces dispositifs peuvent aussi reproduire les phénomènes de zonations observés *in vivo* dus à la mise en place d'un gradient de nutriments ou d'oxygène entre les cellules suivant leur disposition au sein des microsystèmes [3,138,140] (figure 11 : C). Enfin, il est possible d'intégrer des microcapteurs à l'intérieur de ces microsystèmes permettant de suivre les paramètres physico-chimiques (pH, O₂...) des milieux de culture aux cours des expérimentations ou encore de mesurer directement l'absorption et le transport de xénobiotiques fluorescents par exemple [137,140]. Nous décrirons plus en détail quelques-unes de ces méthodes les plus utilisées et innovantes permettant de mimer le fonctionnement de l'intestin et du foie.

1. Méthodes *in vitro* intestinales

1.1. Cultures en boîtes de Pétri

Un certain nombre de dispositifs permettant la culture de tissus et cellules intestinales dans des dispositifs *in vitro* innovants ont vu le jour ces dernières années. Ces dispositifs reposent notamment sur la miniaturisation et l'automatisation des tests et méthodes de culture classiquement utilisés pour la culture de cellules intestinales. La culture se fait de manière classique sur des membranes semi perméables mais des améliorations ont été effectuées.

Ainsi, les tests de perméabilité pratiqués sur les inserts peuvent être automatisés ce qui permet d'augmenter considérablement le nombre de tests effectués par expérimentation [32]. De même des systèmes de culture permettent le raccourcissement de la durée de culture nécessaire à la différenciation des Caco-2. C'est le cas par exemple du dispositif nommé « BD BioCoat™ HTS Caco-2 Assay System » commercialisé par BD Biosciences qui repose sur l'utilisation d'inserts 24 puits. Toutefois, l'utilisation de ce dispositif pour prédire l'absorption intestinale humaine semble remis en question [141]. Des systèmes d'électrodes intégrés aux inserts peuvent aussi permettre de suivre l'intégrité de la barrière intestinale au cours des expérimentations par la mesure de la résistance transépithéliale [142].

1.2. Microsystèmes

La culture de cellules intestinales au sein de microsystèmes a été proposée par différentes équipes. Ainsi, l'équipe de Kimura, H. *et al.* en 2008 [140] a conçu une méthode consistant en l'intégration dans des microsystèmes d'inserts semi perméables classiques sur lesquels sont différenciés des Caco-2. Comme pour la culture de Caco-2 classique, la mise en place de la barrière différenciée va permettre de définir un pôle apical et basal (Figure 10 : A). De plus, cette culture se fait de manière dynamique par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Le grand avantage de ce dispositif est la possibilité de suivre l'absorption ou l'efflux de molécules fluorescentes par l'intermédiaire d'un capteur optique intégré. En termes de fonctionnalité des Caco-2, les auteurs ont montré qu'il y avait bien une différenciation de la barrière intestinale et une activité de transporteurs comme la Pgp après différenciation. Un des désavantages consiste toutefois en la propriété du matériau utilisé pour la fabrication des microsystèmes qui entraîne l'adsorption des composés fluorescents testés durant l'expérimentation. Ce type de culture a montré sa potentialité pour suivre le transport de xénobiotiques [143], mimer certaines particularités de l'intestin comme les mouvements péristaltiques [144] ou encore le développement de structures en 3 dimensions semblables aux villosités intestinales [143,145,146] (Figure 10 : B et C).

On peut aussi donner l'exemple d'une série de microsystèmes développés par l'équipe de Kim, H.J. *et al.* qui permettent de simuler l'environnement de l'intestin [147]. Dans ce dispositif, des Caco-2 sont cultivées sur les deux côtés d'une membrane flexible délimitant deux chambres (Figure 10 : C). La mise en perfusion de ce dispositif et les contraintes mécaniques exercées sur les cellules intestinales par des contractions de la membrane permettent d'obtenir une barrière différenciée. En effet, à l'issue de la culture au sein de ce dispositif, les cellules sont étroitement liées par des jonctions serrées et présentent des structures en 3 dimensions semblables aux villosités [146] (Figure 10 : C). De plus, il est alors possible de cultiver une souche bactérienne intestinale à la surface des Caco-2 qui améliore alors les propriétés de la barrière intestinale, ce qui n'est pas le cas lorsque cette souche est inoculée à des Caco-2 cultivées classiquement sur inserts [147].

D'autres microsystèmes permettent de mimer la fonctionnalité de l'intestin mais aussi d'autres organes au sein du même dispositif [148–150]. Nous décrirons par la suite ce type de dispositif qui permet la co et multiculture de différents types cellulaires.

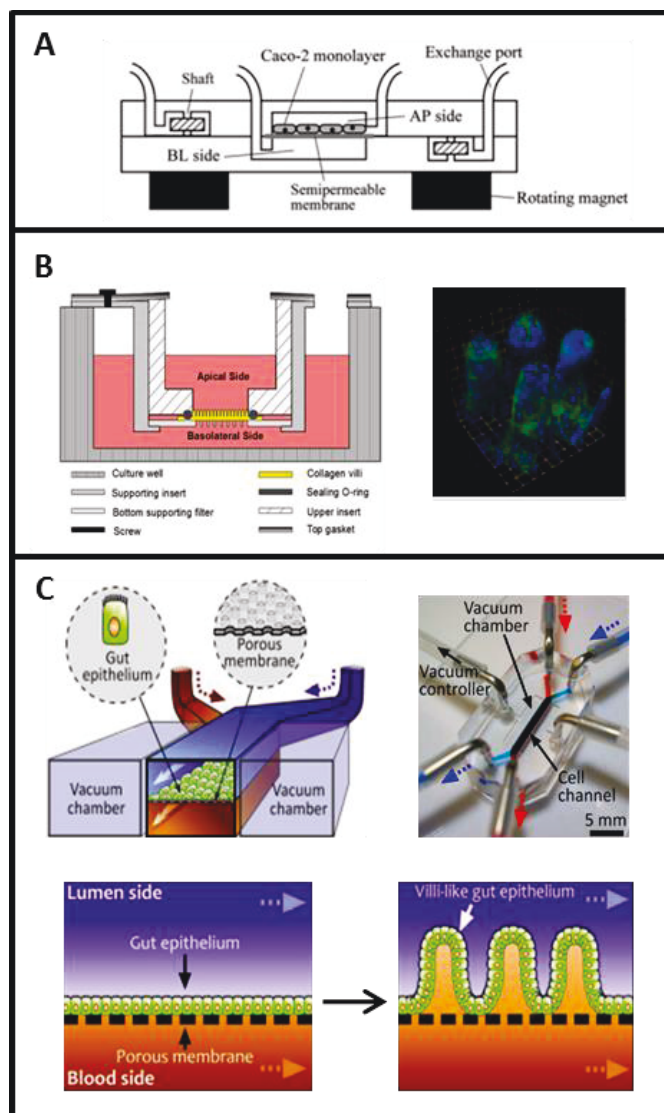


Figure 10 : Exemple de cultures de cellules intestinales au sein de microsystèmes. A. *Microsystème permettant la culture dynamique de Caco-2 sur une barrière semi perméable et intégrant des capteurs optiques pour effectuer des mesures de perméabilité in situ. D'après Kimura, H. et al. [140]. B.* *Culture de cellules intestinales sur des structures en 3 dimensions similaires aux villosités. D'après Yu, J. et al. [143]. C* *Microsystème permettant de simuler les mouvements péristaltiques et induisant la formation de structures semblables aux villosités. D'après Kim, H.J. and Ingber, D.E. [146].*

2. Méthodes *in vitro* hépatiques

La mise en place de cultures *in vitro* permettant de maintenir la fonctionnalité des hépatocytes primaires s'avère cruciale que ce soit dans l'étude des paramètres d'ADME de xénobiotiques ou que ce soit dans la mise en place de foies bioartificiels. Un autre défi est d'améliorer les performances métaboliques des lignées hépatiques qui lorsqu'elles sont cultivées classiquement en boîte de Pétri sont très faibles, ce qui constitue leur défaut majeur dans le cadre d'études pharmacocinétiques et de toxicité [6,11]. C'est pour ces raisons que de nombreux dispositifs de culture innovants d'hépatocytes ont vu le jour ces dernières années. Il est ainsi possible de cultiver les hépatocytes sur des structures obtenues après électrospinning, impression en 3 dimensions mais aussi au sein de billes, de microsystèmes, etc. Ces cultures vont permettre la réorganisation des hépatocytes en 3 dimensions, de favoriser les interactions cellules-cellules et plus généralement de se placer dans un environnement de culture le plus proche possible de celui que l'on retrouve *in vivo*. Toutefois, pour simplifier leur description, on peut les diviser en 3 catégories choisies parmi les plus utilisées : la culture des hépatocytes en sphéroïdes et billes, en sandwich et en microsystèmes.

2.1. Sphéroïdes et billes

Les cellules hépatiques peuvent être cultivées en agrégats aussi appelés sphéroïdes d'environ 100-250 μm de diamètre (Figure 11 : A). Toutefois, lorsque ce diamètre dépasse 200 μm , la viabilité des hépatocytes au cœur des sphéroïdes peut se dégrader sensiblement par manque de nutriments et d'oxygène [79]. Cette culture est possible aussi bien avec des cellules hépatiques de lignée que des hépatocytes primaires animaux et humains. Pour former les agrégats, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri recouvertes d'une matrice aux propriétés non adhérentes [151]. Les cellules vont alors spontanément former des sphéroïdes au bout de quelques jours. Ces agrégats peuvent aussi être formés par la culture des cellules hépatiques avec un système de culture dynamique ou par la technique appelée « hanging drop » [151]. Cette dernière consiste à déposer des gouttes de milieu contenant les hépatocytes dans des plaques. Lorsque les plaques sont retournées, la gravité entraîne la formation de sphéroïdes. La culture en sphéroïdes permet aux cellules hépatiques de maintenir des contacts de type cellules-cellules et de différencier une

morphologie et des caractéristiques similaires à celles des hépatocytes *in vivo* [152]. En effet, la culture en sphéroïdes permet, entre autres, la mise en place de canalicules biliaires par les cellules hépatiques [152,153]. Elle permet de maintenir la fonctionnalité et la viabilité des hépatocytes primaires sur un plus long terme que la culture classique de ces hépatocytes en monocouches ou en suspension [9,154]. Ainsi, la viabilité des hépatocytes primaires en sphéroïdes est largement supérieure à celle des hépatocytes cultivés en monocouches [155]. De plus, les hépatocytes cultivés en sphéroïdes peuvent maintenir l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme des xénobiotiques jusqu'à 14 jours. L'activité des EMX reste inductible pendant cette période [8]. Ce modèle s'avère donc intéressant à utiliser dans le cadre de l'évaluation des paramètres d'ADME de xénobiotiques et de leur potentielle toxicité [156]. Enfin, les sphéroïdes produits peuvent être cultivés de manière dynamique dans des bioréacteurs ce qui potentialise les échanges de nutriments et d'oxygène et améliore encore les propriétés des hépatocytes [157].

La culture en trois dimensions des hépatocytes peut aussi se faire en billes. Dans ce cas, les hépatocytes sont encapsulés dans des matrices comme l'alginate laissant passer l'oxygène et les nutriments. Ce passage peut de plus être optimisé par l'utilisation de lits fluidisés. Les hépatocytes forment des structures en 3 dimensions au sein des billes ce qui entraîne une différenciation morphologique ainsi qu'un maintien, voire une amélioration de la fonctionnalité de ces hépatocytes de la même façon que dans le cas des sphéroïdes décrits précédemment [79,158–160]. De plus, cette technique offre de nombreux avantages comme la possibilité de cryopréserver les billes et de les stocker durant des mois tout en préservant les capacités des hépatocytes, ce qui n'est pas le cas lorsque les hépatocytes isolés sont congelés [161]. Cette technique est particulièrement intéressante à utiliser en implantation et plus généralement dans la thématique du foie bioartificiel [162]. L'utilisation d'hépatocytes organisés en 3 dimensions par ces deux types de méthodes présente donc de nombreux atouts.

Toutefois, leur utilisation peut présenter certains désavantages. Ils consistent notamment en la difficulté d'oxygéner convenablement les cellules au centre des sphéroïdes et billes ce qui peut induire la formation de cœur nécrotique au centre de ces structures

[138]. De plus, l'organisation en sphères des hépatocytes n'est pas représentative de l'organisation générale de ces cellules *in vivo* [138] même si elle permet aux cellules de conserver en partie leur phénotype initial. Une autre difficulté est d'obtenir des sphéroïdes ayant un diamètre similaire, ce qui limite la répétabilité des expérimentations [138]. Enfin, la mise en place de ces systèmes de culture nécessite beaucoup de temps ainsi qu'un grand volume de composants et de milieux de culture [79].

2.2. Culture en sandwich

Cette technique consiste en la culture d'hépatocytes en 3 dimensions. Pour la réaliser, les hépatocytes sont cultivés entre deux couches de matrice extracellulaire comme du collagène, matrigel (Figure 11 : B)... Cette configuration permet d'améliorer considérablement les caractéristiques des hépatocytes ainsi que de conserver leur viabilité et leur fonctionnalité sur une longue période [138,163–165]. Il a ainsi été montré que cette méthode favorisait le développement d'une part des jonctions entre les hépatocytes et d'autre part de canalicules biliaires fonctionnels [166,167] et entraînait la modification morphologique des hépatocytes qui se rapproche de celle retrouvée *in vivo* [138,168]. De même, l'organisation générale des hépatocytes en rangées se rapproche de celle des lobules hépatiques *in vivo* [138]. De plus, de nombreuses EMX de phase I et II restent fonctionnelles et inductibles dans cette configuration sur une durée allant de 7 jours à plusieurs semaines pour certaines, ce qui en fait un modèle de pharmacocinétique intéressant [10,169–171]. Enfin, la culture en sandwich peut être conjuguée à une perfusion ce qui améliore encore la viabilité et la fonctionnalité des hépatocytes [172] ainsi que leur sensibilité aux xénobiotiques ce qui rend intéressant ce modèle pour étudier l'hépatotoxicité de certains composés [173].

Cette culture d'hépatocytes en sandwich présente malgré tout des désavantages comme la difficulté à isoler des cellules intactes de la structure en sandwich à la fin des expérimentations. Ce modèle reste cependant intéressant pour étudier le fonctionnement d'hépatocytes et notamment le métabolisme et l'excrétion de xénobiotiques dans des conditions qui se rapprochent de celles que l'on retrouve *in vivo* [174].

2.3. Microsystèmes

Un grand nombre de ces dispositifs permettant de cultiver des cellules hépatiques au sein de microsystèmes et sous un flux de milieu de culture a été mis au point ces dernières années.

En contrôlant de manière indépendante la vitesse du flux de milieu de culture et son oxygénation, il est possible de mettre en évidence des phénomènes de zonation notamment en terme d'activité de CYPs ainsi que l'effet d'un stress mécanique sur les hépatocytes [3,4]. Ce phénomène de zonation peut être induit au sein des microsystème par un gradient chimique de concentration en oxygène le long des microcanaux [4,175] (Figure 11 : C).

Le flux de milieu de culture permet aussi d'accroître significativement la viabilité et la fonctionnalité des hépatocytes primaires et des lignées hépatiques. Il est ainsi possible de cultiver des cellules hépatiques au sein de ces microsystèmes sur une longue durée [17,176,177]. En effet, leur production d'albumine, leur production d'urée et leur viabilité sont bien supérieures et plus durables que lorsque les hépatocytes sont cultivés de manière classique et statique dans des boîtes de Pétri [176,177].

De plus, les hépatocytes cultivés dans ces dispositifs présentent une fonctionnalité similaire aux hépatocytes *in vivo* qu'ils soient primaires ou issus d'une lignée, notamment en termes d'activité des EMX [11]. Cela en fait donc des modèles intéressants pour l'étude des paramètres d'ADME de xénobiotiques et de leurs toxicités [20].

Certain de ces microsystèmes vont de plus permettre la culture en 3 dimensions des hépatocytes sous forme d'agrégats comme c'est le cas du dispositif HepaTox Chip [178] (Figure 11 : D) ou même reproduire l'organisation des hépatocytes *in vivo* [2]. Les hépatocytes forment alors des structures tridimensionnelles permettant de restaurer les interactions cellules-cellules, améliorant la fonctionnalité des hépatocytes et aboutissant à la possibilité de cultiver les cellules hépatiques sur un long terme (jusqu'à 4 semaines) [2]. Cette culture à long terme est particulièrement intéressante pour étudier les mécanismes de toxicité chronique de xénobiotiques.

Il est aussi possible de cultiver de manière dynamique des fragments hépatiques dans des microsystèmes (Figure 11 : E). Cela permet de conserver la viabilité et fonctionnalité des tissus plus longtemps que pour la culture classique de ces tissus. Toutefois, cette durée reste limitée [179].

L'utilisation des microsystemes présente toutefois des désavantages comme l'adsorption non spécifique des xénobiotiques testés ou des molécules introduites par le matériel constituant les microsystemes ainsi que la production d'un faible nombre de réplicats.

Ces microsystemes peuvent toutefois être combinés et parallélisés ce qui permet d'augmenter le nombre de réplicats utilisables pour chaque expérimentation. C'est le cas du dispositif nommé IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) conçu par l'équipe du Dr Leclerc dans lequel douze microsystemes peuvent être intégrés et perfusés [12] (Figure 11 : F). Les microsystemes utilisés sont constitués de polydiméthylsiloxane (PDMS), un matériel perméable aux gaz, transparent et biocompatible. Ils possèdent une face microstructurée composée de microcanaux dans lesquels sontensemencées les cellules hépatiques après dépôt d'une matrice extracellulaire de type collagène. Les cellules hépatiques cultivées dans ces dispositifs présentent une fonctionnalité plus proche de celle des hépatocytes *in vivo* comparativement aux modèles statiques et classiques de culture, notamment en terme de production d'albumine et d'activité des EMX [12,180]. Différentes études ont montré le potentiel de ce dispositif et de tels microsystemes dans le suivi du métabolisme [181] et de la toxicité [20] de xénobiotiques aussi bien sur des cellules de lignée que primaires [182].

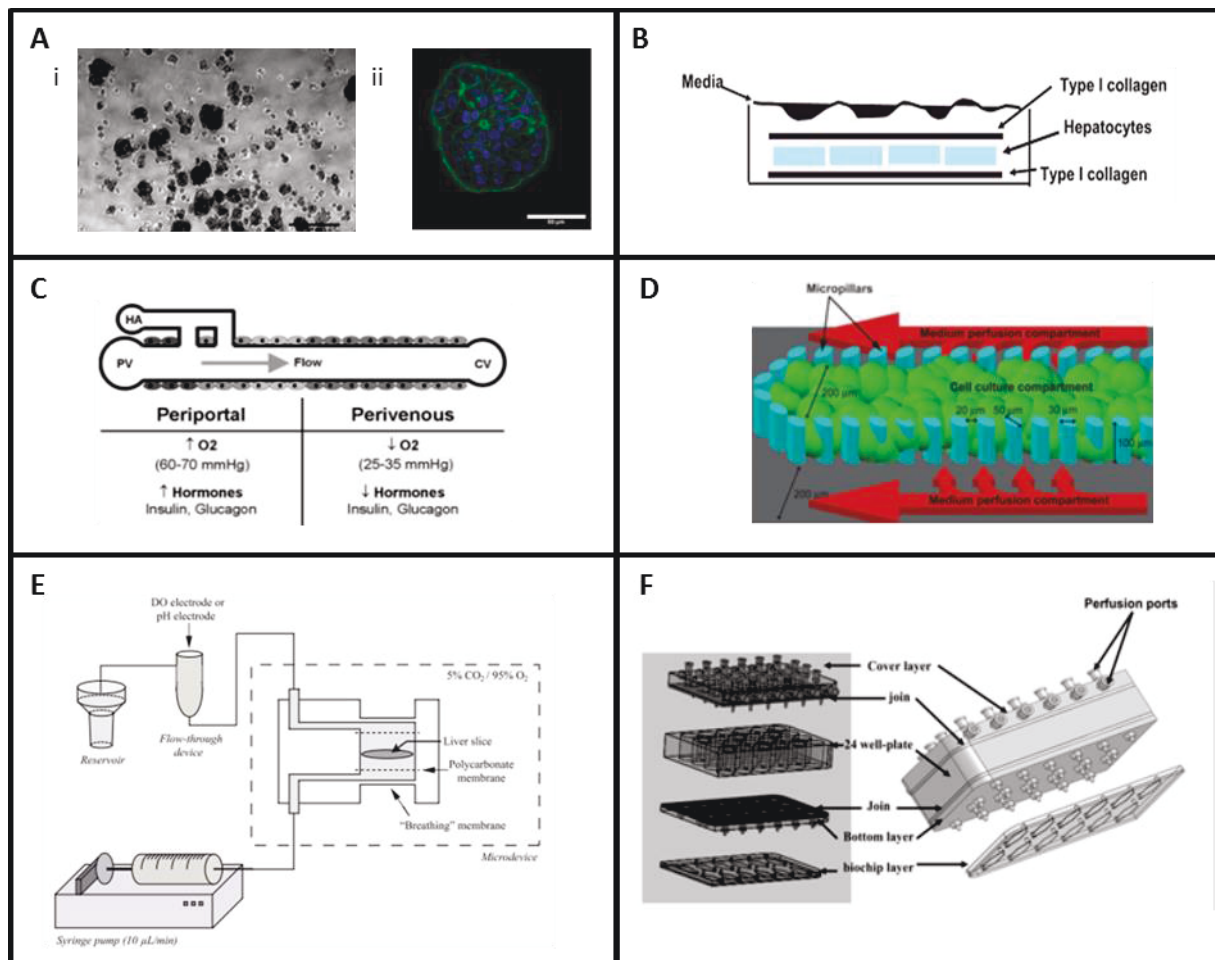


Figure 11 : Méthodes de culture in vitro alternatives innovantes d'hépatocytes et tissus hépatiques. A. Culture d'hépatocytes en sphéroïdes: i microscopie en contraste de phase, ii marquage des noyaux (bleu) et des jonctions (vert). D'après Tostões, R.M. et al. [157]. **B.** Culture d'hépatocytes en sandwich, entre deux couches de collagène. D'après Wilson, A.G.E. et al. [165]. **C.** Phénomène de zonation reproduit en microsystème. Les cellules hépatiques sont cultivées en rangée et des gradients de concentration en oxygène mais aussi en hormones sont induits pour reproduire l'organisation et les conditions physiologiques des lobules hépatiques. PV = veine portale, HA = artère hépatique, CV = veine centrale. D'après Allen, J.W. and Bhatia, S.N. [4]. **D.** Culture de cellules hépatiques au sein d'un microsystème (Hepatox chip). Les cellules vont former des structures en 3 dimensions sous l'influence d'un flux de milieu de culture D'après Toh, Y.-C. et al. [178]. **E.** Culture de fragments hépatiques au sein de microsystèmes perfusés. D'après Van Midwoud, P.M. et al. [183]. **F.** Culture dynamique de cellules hépatiques dans des microsystèmes parallélisés et intégrés au sein du dispositif IDCCM. D'après Legendre, A. et al. [12].

3. Modèles *in vitro* de coculture intestin/foie

Les dispositifs décrits précédemment améliorent donc sensiblement la fonctionnalité et la viabilité des cellules intestinales ou hépatiques. Toutefois, ces dispositifs ne permettent pas de reproduire les interactions entre organes qui peuvent être déterminantes dans les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion des xénobiotiques. Mimer ces interactions par des dispositifs *in vitro* élaborés constitue donc un enjeu particulièrement important pour déterminer la toxicité potentielle de xénobiotiques ou encore pour développer à moindre coût des molécules thérapeutiques. C'est pour ces raisons que le nombre de dispositifs permettant de reproduire les interactions de deux organes majeurs dans les paramètres d'ADME de xénobiotiques comme l'intestin et le foie n'a cessé de croître ces dernières années. Ces dispositifs consistent bien souvent en l'association de dispositifs classiques *in vitro* ou *ex vivo* décrits précédemment, chacun mimant le fonctionnement d'un de ces deux organes.

3.1. Coculture statique

Il est possible de superposer la culture classique de Caco-2 sur des membranes semi perméables à celle d'hépatocytes cultivés en monocouche [184,185] (Figure 12 : A) ou en suspension au fond de boîte de Petri [186] (Figure 12 : B). Cette méthode présente l'avantage d'être simple à mettre en place et de permettre d'étudier rapidement les interactions entre ces deux types cellulaires. Elle a ainsi été effectuée avec une coculture de Caco-2 TC7 et de HepaRG [185], de Caco-2 et de HepG2 [184] ou encore de Caco-2 et d'hépatocytes primaires humains en suspension [186]. Ces méthodes permettent de suivre le transport à travers la barrière intestinale et le métabolisme ainsi que l'excrétion de xénobiotiques comme le benzo(a)pyrène par les cellules hépatiques. Dans ce dernier cas, les auteurs ont montré que les résultats de métabolisme et de toxicité du benzo(a)pyrène obtenus avec leur dispositif étaient plus proches de ceux retrouvés *in vivo* du fait d'une interaction entre les cellules intestinales et hépatiques [184]. Toutefois, la culture en monocouche et de manière statique de ces deux types cellulaires ne permet pas de mimer au mieux les conditions *in vivo*.

3.2. Coculture dynamique

Pour répondre à ce besoin, un certain nombre de dispositifs innovants permettant la coculture dynamique de compartiments intestinaux et hépatiques ont été mis en place.

i. Coculture organotypique

Ainsi, l'équipe de Van midwoud *et al* a montré qu'il était possible d'associer la culture de fragments intestinaux et hépatiques au sein de microsystemes pour étudier les interactions intestin-foie [148]. Ces microsystemes sont eux-mêmes insérés dans un dispositif qui permet leur perfusion (Figure 12 : C). Ce dispositif permet de conserver l'intégrité des fragments hépatiques jusqu'à 24h de perfusion [179] et des fragments intestinaux pendant 3h de culture et d'améliorer la morphologie de ces fragments comparativement à leur simple culture statique en boîte de Pétri [148]. Cette étude a démontré la potentialité de la culture dynamique alternée de fragments intestinaux et hépatiques pour étudier les effets de premiers passages intestinaux et hépatiques. L'utilisation de ces dispositifs s'avère pertinente pour étudier les interactions entre ces deux organes, notamment l'impact de la production de métabolites par l'intestin sur la fonctionnalité du foie [187]. Ils permettent de conserver en partie la complexité de l'*in vivo* par l'utilisation d'explants. Toutefois, même si ces dispositifs permettent la culture des tissus sur une plus longue durée que dans les systèmes classiques de culture, elle reste limitée. De même, l'utilisation de fragments d'organes implique l'utilisation de modèles animaux limitant ainsi l'extrapolation des résultats à l'Homme.

ii. Coculture en bioréacteur

D'autres équipes ont proposé la culture dynamique de cellules intestinales et hépatiques au sein de chambres reliées les unes aux autres. Ainsi, Sakai, Y. *et al* ont développé un dispositif constitué de 3 chambres perfusées [188] (Figure 12 : D). Des Caco-2 étaient cultivées sur une membrane semi-perméable dans la première, des HepG2 dans la deuxième et la troisième était laissée vide afin d'y intégrer une autre population cellulaire dans leurs prochaines études. Les auteurs ont montré que ce dispositif permettait de suivre l'absorption intestinale et le métabolisme du benzo(a)pyrène, une molécule métabolisée par le CYP1A1/2, dans le compartiment intestinal et hépatique [188–190]. De plus, le flux de milieu de culture permet de conserver la viabilité et l'activité des cellules ainsi que d'accroître la prolifération des HepG2 [190].

iii. Coculture en microsystemes

L'équipe de Shuler *et al* a mis au point des microsystemes composés de microchambres dans lesquelles étaient cultivées, entre autres, des cellules intestinales et hépatiques [149,191] (Figure 12 : E). Chaque chambre mime donc l'activité d'un organe. Ces dispositifs appelés μ CCA (microscale cell culture analog) se basent sur des données issues de modèles PBPK pour déterminer le flux et le temps de résidence du milieu de culture entre les différentes chambres [192]. Fixer ces paramètres permet de se rapprocher dans la mesure du possible des conditions *in vivo* de perfusion des différents organes et d'étudier les interactions entre organes. Le modèle est composé de 5 chambres mimant d'une part le fonctionnement de l'intestin par la culture de Caco-2 et de HT29 et d'autre part celui du foie par la culture de HepG2 C3A mais aussi celui d'autres organes comme le tissu adipeux, la moelle osseuse et les reins [192]. Ce dispositif a alors permis de suivre les paramètres d'ADME et la toxicité de molécules comme le paracétamol.

D'autres microsystemes proposent de la même manière de mettre en communication des compartiments mimant chacun la fonctionnalité d'un organe. On peut ainsi citer le dispositif appelé 3D- μ FCCS (3D microfluidic cell culture system) qui permet la culture en 3 dimensions des cellules cultivées dans les différentes chambres et perfusées par l'intermédiaire de microcapillaires [150] (Figure 12 : F).

L'utilisation des microsystemes dans un but de culture des cellules intestinales et hépatiques s'avère donc prometteuse en particulier pour des études pharmacocinétiques. En effet, ces microsystemes outre les avantages décrits précédemment comme la possibilité de cultiver les cellules hépatiques sur un long terme, le maintien de l'activité et de la viabilité des cellules, l'amélioration du métabolisme des cellules de lignée, l'induction potentielle d'un phénomène de zonation... permettent de mimer et d'étudier les interactions entre organes. Toutefois, l'utilisation de ces microsystemes comporte des désavantages comme l'adsorption non spécifique par les matériaux des composants des milieux de culture ou encore celle des xénobiotiques testés [193] ainsi que la difficulté de mise en place et d'utilisation.

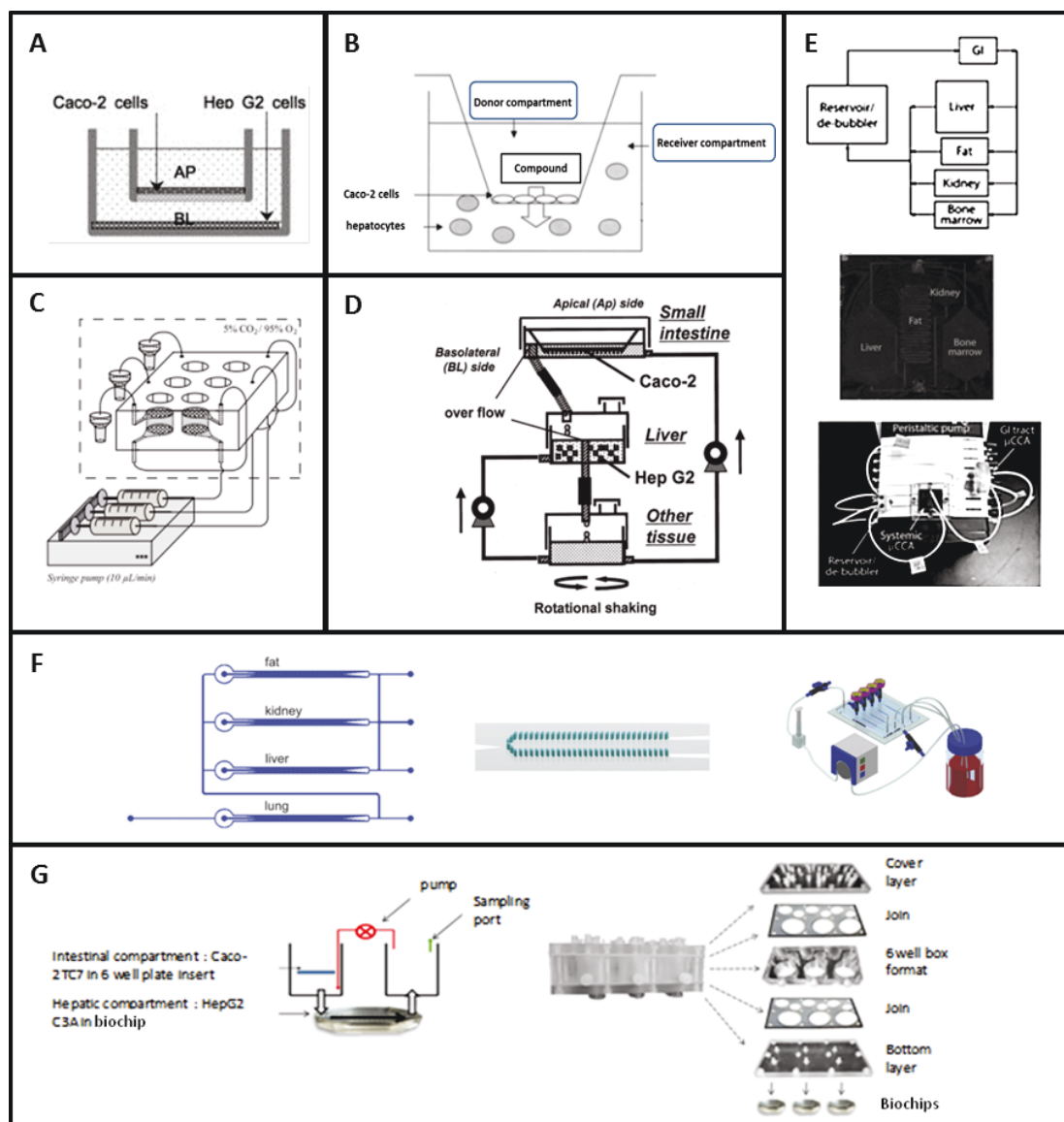


Figure 12 : Dispositifs de coculture intestin/foie. Les cellules intestinales (Caco-2) peuvent être cultivées sur des membranes semi perméables et superposées à la culture de cellules hépatiques (HepG2) **A** en monocouche, ou **B** en suspensions. D'après Choi, S. et al. [184] and Lau, Y.Y. et al. [186]. **C.** Des fragments intestinaux et hépatiques sont cultivés au sein de microsystèmes et associés dans un dispositif permettant leurs perfusions alternées. D'après Van Midwoud, P.M. et al. [148]. **D.** Les cellules intestinales sont cultivées sur une membrane semi perméables au sein d'un compartiment intestinal et les cellules hépatiques en suspension au sein d'un compartiment hépatique. Ces deux compartiments vont être mis en communication par l'intermédiaire d'un flux de milieu de culture. D'après Sakai, Y. et al. [188]. **E** et **F.** Différents types cellulaires comme des cellules intestinales et hépatiques peuvent être cultivés dans chacune des chambres de microsystèmes. D'après Zhang, C. et al. and Mahler, G.J. et al. [150,192]. **F.** Les débits et les volumes des milieux de culture permettant la communication entre les différentes chambres peuvent être déterminés préalablement par l'intermédiaire de modèles PBPK. D'après Mahler, G.J. et al. [192]. **G.** Dispositif de culture (IIDMP) permettant d'associer la culture de Caco-2 TC7 sur des inserts à celle de HepG2 au sein de microsystèmes. La parallélisation de ces microsystèmes permet d'associer trois réplicats à chaque dispositif. D'après Bricks, T. et al. [13].

VI. CONCLUSION ET OBJECTIFS DU DOCTORAT

Nous avons donc vu, tout au long de cette première partie, que l'intestin et le foie sont deux organes jouant un rôle particulièrement important dans les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion de nombreux xénobiotiques. En effet, ces deux organes sont à l'origine d'effets de premiers passages pouvant entraîner une diminution conséquente de la biodisponibilité des xénobiotiques. Cette diminution pourra, par exemple, limiter les effets escomptés des médicaments ou encore la toxicité potentielle de nombreux xénobiotiques. A l'heure actuelle, une grande partie des méthodes *in vitro* utilisées pour prédire la biodisponibilité des xénobiotiques ne permet pas de mimer de manière prédictive ces effets de premiers passages. De plus, ces méthodes ne reproduisent pas les effets de premiers passages intestinaux qui peuvent être importants, les possibles interactions entre les organes ou encore le microenvironnement cellulaire [194]. En effet, la plupart de ces méthodes repose sur l'utilisation d'hépatocytes en suspension ou en monoculture dans des boîtes de Pétri [195]. Lorsque les effets intestinaux sont pris en compte, notamment dans le cadre du calcul des biodisponibilités orales des xénobiotiques, il s'agit bien souvent de résultats obtenus à l'aide de cultures de cellules intestinales et hépatiques effectuées séparément [196]. De plus, l'effet intestinal sur la biodisponibilité est alors limité à la perméabilité de l'intestin aux xénobiotiques étudiés, ce qui ne prend pas en compte un éventuel métabolisme intestinal [197]. Enfin, la culture des hépatocytes en suspension ou en boîtes de Pétri entraîne un certain nombre de limitations comme une diminution rapide de l'activité des EMX des hépatocytes primaires au cours du temps ou à une activité d'EMX faible dans le cadre de la culture d'hépatocytes issus de lignées [6,195]. L'utilisation de ces méthodes en substitution et/ou en complément des expérimentations animales peut donc conduire à la sous-estimation d'effets toxiques qui sont ensuite découverts lors des stades tardifs du développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'abandon du développement de ces molécules est alors à l'origine d'un coût important pour l'industrie pharmaceutique [53].

Mettre au point des méthodes *in vitro* fiables et prédictives permettant de mimer le fonctionnement de ces deux organes et de retranscrire les effets de premiers passages intestinaux et hépatiques représente donc un véritable enjeu aussi bien en termes

économique qu'éthique. C'est dans ce contexte qu'a été mis au point un nouveau dispositif par l'équipe du Dr. Leclerc au sein du laboratoire de Biomécanique-Bioingénierie de l'Université de Technologie de Compiègne. Ce dispositif appelé IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) repose sur l'association de Caco-2 TC7 cultivées sur des membranes semi perméables et de cellules hépatiques cultivées au sein de microsystèmes (Figure 12 : G) [13]. En effet, il a été montré que la culture d'hépatocytes au sein de ces microsystèmes dans des conditions dynamiques de culture permettait d'améliorer le métabolisme et la fonctionnalité des hépatocytes en particulier lorsqu'ils étaient issus de lignées comme démontré précédemment avec le dispositif IDCCM [11,12,17,18,20,180–182].

Nous étudierons dans ce manuscrit la fonctionnalité de ce dispositif de coculture et son potentiel d'utilisation au cours de trois articles. Pour cela, la faisabilité du dispositif et l'apparition d'interactions entre cellules intestinales et hépatiques ont été étudiées, en utilisant des cellules issues de lignées (Caco-2 TC7 et HepG2 C3A), dans le premier article inséré dans la suite de ce manuscrit. L'effet de la culture dynamique d'hépatocytes primaires humains dans des microsystèmes a été étudié au sein du deuxième article. Enfin, les expérimentations pratiquées dans le cadre du troisième article ont eu pour but de mettre en évidence de potentielles interactions entre Caco-2 TC7 et hépatocytes primaires humains ainsi qu'un éventuel bénéfice apporté par l'utilisation de ce dispositif en comparaison avec des méthodes classiques *in vitro*. Pour cela, les biodisponibilités orales associées à l'absorption et au métabolisme intestinal et hépatique de deux molécules thérapeutiques ont été calculées à l'aide d'un modèle de pharmacocinétique.

CHAPITRE 3: MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. FABRICATION DES MICROSYSTÈMES

Le dispositif de coculture IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) développé lors de ce doctorat permet d'associer la culture de cellules intestinales sur des membranes à celle de cellules hépatiques au sein de microsystemes. Ces microsystemes sont fabriqués à l'aide d'un matériel appelé polydiméthylsiloxane ou PDMS (Sylgard 184 Kit, Dow Corning, France), connu pour ses propriétés particulièrement intéressantes dans le cadre de la fabrication de supports de culture. En effet, il est transparent, flexible, perméable aux gaz comme le CO₂ et l'O₂, autoclavable ou encore biocompatible. Initialement liquide, il peut donc être coulé avec précision dans des moules. Lorsqu'il est mélangé à un agent réticulant et après une étape de solidification dans des conditions de température définies, il devient solide et apte à être démoulé rapidement. Il peut alors être associé de manière irréversible à d'autres supports en PDMS ou encore en verre après une étape d'activation de sa surface par plasma à oxygène. Cela en fait donc un matériel de choix notamment dans des étapes de microfabrication, ce qui explique sa large utilisation pour la fabrication de microsystemes.

Les microsystemes utilisés au sein du laboratoire sont constitués de deux faces : une face supérieure lisse et une face inférieure microstructurée (Figure 13). Un moule correspond à la face supérieure et un autre à la face inférieure.

Ces deux faces, sont constituées de PDMS associé à un agent réticulant (proportion 10/1) initialement coulés dans les moules appropriés. Le volume de PDMS correspondant à chacun des moules est fixé afin d'harmoniser la taille des microsystemes. Les épaisseurs de la face supérieure et inférieure ont été fixées à 5 mm et 3,5 mm respectivement.

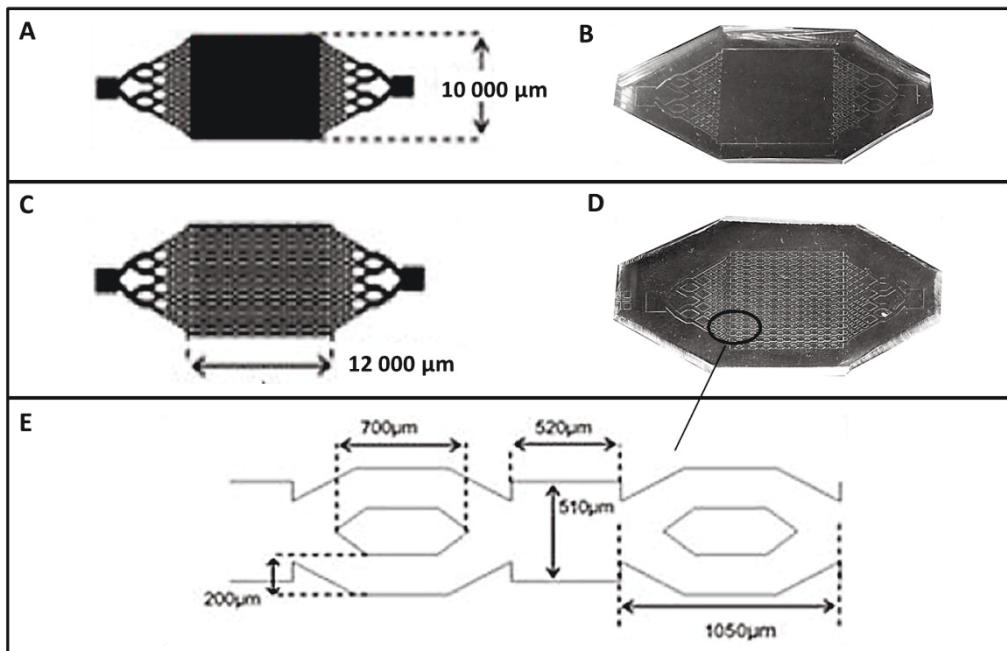


Figure 13 : Conception et structure des microsystèmes. Les microsystèmes sont constitués d'une face supérieure lisse (A et B) et d'une face inférieure microstructurée (C et D). Les microstructures sont constituées d'une succession de canaux et de chambres (E). Les faces en PDMS (B et D) sont obtenues après polymérisation du PDMS dans des moules aux motifs correspondants à chacune des faces (A et C).

Après solidification des deux faces à une température de 75 °C pendant 2h au minimum, elles sont démoulées. La face supérieure non microstructurée est alors percée à chacune de ses extrémités, ce qui permet la connexion des microsystèmes aux dispositifs assurant leur perfusion [13,19,178]. Les deux faces sont ensuite associées après une étape de bonding à l'aide d'un plasma à oxygène. Durant cette étape, la surface en PDMS des deux faces est oxydée ce qui permet leur association par des liaisons covalentes. La structure finale constituée de l'association des deux faces est appelée microsystème ou biopuce. Avant chaque expérimentation, les microsystèmes sont nettoyés successivement à l'aide de solution de SDS 2% (1 lavage) et d'eau milliQ (3 lavages). Ils sont ensuite séchés à une température de 37°C puis autoclavés avant leur utilisation dans le cadre d'une culture cellulaire.

Les moules ont été préalablement conçus à partir de masques dont le design a été conçu par le Dr E. Leclerc (brevet n°0954288-2009). Après des étapes de photolithographies décrites plus en détail précédemment [198], les masques sont convertis en moules par l'équipe de Vincent Senez et Thomas Dargent de l'UMR CNRS 8520 : Institut d'électronique,

de microélectronique et de nanotechnologie (IEMN). Le design des microcanaux de la face inférieure a été conçu afin d'optimiser l'adhésion des cellules ainsi que l'écoulement des fluides au sein des microsystèmes. Chacun des microcanaux est constitué de la succession d'un canal de 1050 μm de long et d'une chambre de 520 sur 510 μm . Ce motif est répété 9 fois sur chaque ligne de la face inférieure (15 lignes) (Figure 1). Le nombre total de chambres contenues par la face inférieure est donc de 135 et les microsystèmes peuvent contenir 45 μl de milieu de culture. Les cellules hépatiques cultivées au sein des microsystèmes et dans les microcanaux disposent au final d'une surface d'adhésion de 1,97 cm^2 .

II. CULTURE CELLULAIRE

1. Culture des lignées cellulaires et composition des milieux de culture

Les cellules intestinales de lignée appelées Caco-2 TC7 (voir description des propriétés dans la partie précédente) nous ont été fournies par le Dr M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France) et les cellules hépatiques de lignée HepG2 C3A ont été achetées à l'American Type Culture Collection (ATCC). Les milieux de culture utilisés pour ces deux types cellulaires sont les mêmes : du milieu MEM (Minimal Essential Medium) complété avec 10% de sérum de veau foetal, 1% d'acides aminés non essentiel (100x), 1% d'HEPES (hydroxyethylpiperazine-N 0 2-ethanesulfonic acid, 1M), 100 unités/ml de pénicilline-streptomycine, 1% de L-Glutamine à 200 mM et 1% de sodium pyruvate 100 mM. Le MEM et tous les composants du milieu de culture sont achetés chez Gibco. Ce milieu de culture a été utilisé pour les deux types cellulaires, que ce soit durant les étapes d'ensemencement ou que ce soit durant les étapes de culture des cellules dans les boîtes de Pétri/inserts ou dans les microsystemes.

L'entretien des cellules a été effectué dans des flasques de 75 cm² à une température de 37°C et sous une atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Le milieu a été changé tous les deux jours pour les deux types cellulaires.

Lorsque les Caco-2 TC7 ont atteint 80% de confluence, elles ont été détachées à l'aide de trypsine-EDTA (0,25 %, 7 mM, Gibco, France) puisensemencées directement dans des membranes en polycarbonate (format 6 puits, 24 mm de diamètre et pores de 0,4 µm, traitée TC, Sigma Aldrich SA, Saint Quentin Fallavier, France). La densité d'ensemencement a été fixée à 100 000 cellules/cm² et cet ensemencement pratiqué 21 jours avant le début des expérimentations.

Les HepG2 C3A ont été cultivées classiquement au sein de flasques T75 comme décrit précédemment.

Pour limiter la variabilité des résultats obtenus à chaque expérience, les Caco-2 TC7 ont été utilisées entre les passages 25 et 45 et les HepG2 C3A entre les passages 10 et 35.

2. Culture des hépatocytes primaires humains et composition des milieux de culture

Les hépatocytes primaires humains ont été achetés en cryotubes à la bio-banque de Picardie (Amiens, France) et à Biopredic (Rennes, France). Le milieu de culture utilisé est du milieu de culture pour hépatocytes (HBM™ Medium, CC-3199 Lonza) complété par de l'acide ascorbique, de l'albumine de sérum bovin et des acides gras libres (BSA-FAF), du facteur de croissance humain épidermique (hEGF), de la transferrine, de l'insuline et de la Gentamicine/Amphotéricine (HCM™ SingleQuots™ Kit, CC-4182). Le milieu de culture basal et les compléments ont été achetés à Lonza.

Au premier jour des expériences impliquant l'utilisation des hépatocytes primaires, ceux-ci ont été décongelés puisensemencés en suivant le protocole proposé par Lonza (h NHEPS™ Cells– Instructions for Use). A chaque expérimentation, le contenu de deux cryotubes issus de deux donneurs différents a été mélangé. La densité d'ensemencement dans les boîtes de Pétri et les microsystèmes a été fixée à 125 000 cellules/cm². Le milieu d'ensemencement choisi est le même que le milieu de culture (HBM complémenté décrit précédemment) auquel l'on a additionné 2% de sérum de veau fœtal. Après l'étape d'adhésion des cellules, ce milieu d'ensemencement a été remplacé par du milieu basal sans ajout de sérum.

III. DISPOSITIF DE COCULTURE

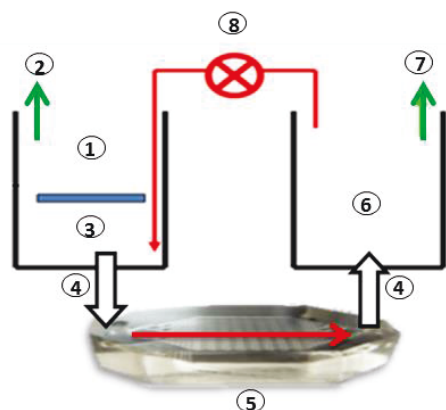
1. Conception

Le dispositif de coculture associant la fonction de barrière intestinale et le métabolisme hépatique a été mis au point au laboratoire de BioMécanique et BioIngénierie de l'UTC et appelé IIDMP pour «Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform ». Il se présente sous l'aspect d'un boîtier en polycarbonate et a pour but de mimer l'activité de transport intestinal et de métabolisme hépatique que l'on retrouve *in vivo*.

Le dispositif est composé de la succession de sous unités permettant chacune :

- La culture de cellules intestinales sur des inserts 6 puits faisant office de barrière intestinale.
- La culture de cellules hépatiques au sein de microsystèmes faisant office de compartiment hépatique. Ces microsystèmes préalablement développés au sein du laboratoire BMBI et dont la fabrication est décrite plus en détail précédemment permettent la culture de cellules dans un milieu de culture sans cesse renouvelé [11,18,19].

Chacune des sous unités est donc constituée de l'association d'un insert et d'un microsystème positionnés dans deux puits (Figure 14). L'insert est positionné dans le premier puits (puits n°1) et délimite un pôle apical (compartiment intestinal) correspondant à la lumière du tube digestif *in vivo* et un pôle basal qui permet les échanges de milieu entre la barrière intestinale et le compartiment hépatique. Le microsystème est connecté en dessous du premier puits et du deuxième puits (puits n°2). Le compartiment basal du premier puits, le microsystème et le deuxième puits constituent le compartiment hépatique de chaque sous unité du dispositif. Le volume de milieu de culture situé en apical de l'insert est de 1,5 ml, de 8,5 ml en dessous de l'insert et de 2,5 ml dans le puits n°2. La perfusion des microsystèmes est rendue possible par la mise en circulation du milieu de culture du deuxième puits vers le compartiment basal du premier puits. Ce prélèvement du deuxième puits vers le premier se fait sous l'action d'une pompe péristaltique à une vitesse de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.



- ① Compartiment intestinal : Caco-2 Tc7 cultivées sur des inserts adaptés aux plaques 6 puits
- ② Compartiment intestinal : port de prélèvement
- ③ Compartiment hépatique : puits de culture n°1
- ④ Compartiment hépatique : connecteurs
- ⑤ Compartiment hépatique : HepG2 C3A cultivées dans des microsystemes
- ⑥ Compartiment hépatique : puits de culture n°2
- ⑦ Compartiment hépatique : port de prélèvement
- ⑧ Pompe : tuyaux en PTFE

Figure 14 : Schéma d'une unité fonctionnelle de l'IIDMP. D'après Bricks, T. et al. [13].

Le dispositif global IIDMP est constitué de 3 sous unités et permet donc la culture de 3 inserts et 3 biopuces simultanément (Figure 14). Pour chacune des expériences, deux dispositifs ont été utilisés, ce qui a permis d'augmenter le nombre d'inserts et de microsystemes utilisables pour des analyses complémentaires à un total de 6.

La perfusion des fluides est assurée par un couvercle relié à une pompe par l'intermédiaire de tuyaux en silicones (0,64 mm de diamètre, Cole Parmer Instrument Company) et PTFE (polytétrafluoroéthylène). Ce couvercle permet aussi de clore hermétiquement le boîtier et d'effectuer des prélèvements dans les compartiments intestinaux et hépatiques par l'intermédiaire de ports spécifiques (Figure 15). Les autres composants du boîtier IIDMP sont des joints en silicone assurant l'étanchéité du dispositif, une face médiane délimitant chacun des puits des sous unités et une face inférieure permettant la fixation des microsystemes au dispositif (Figure 15).

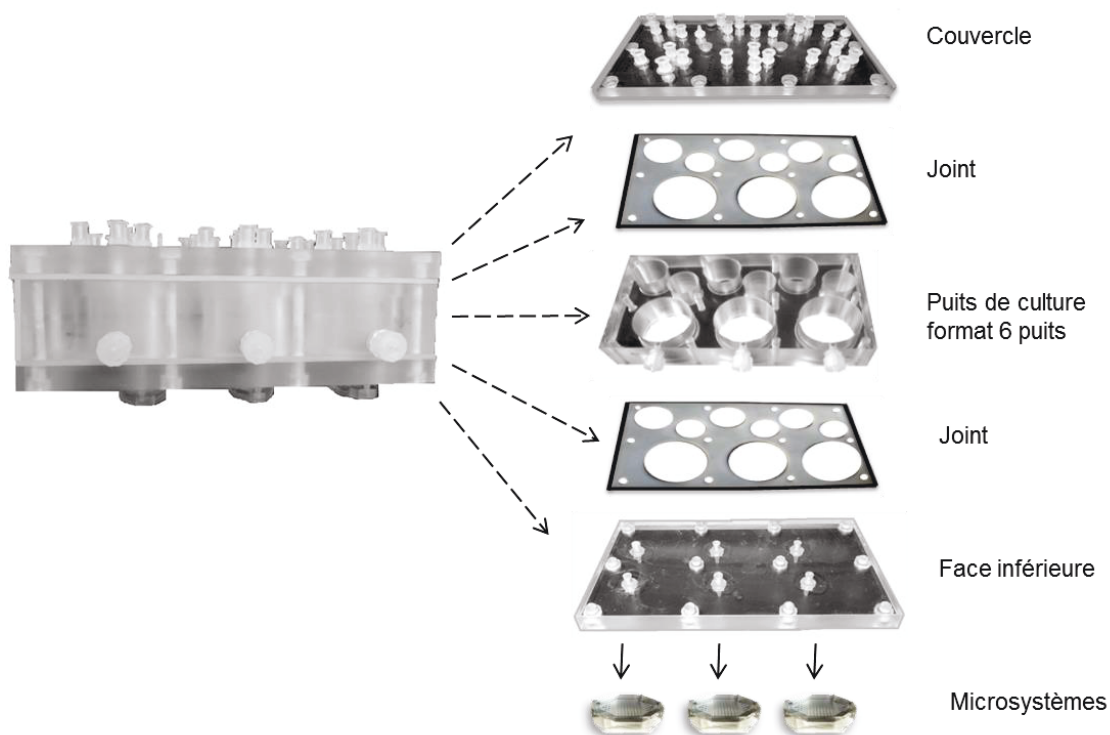


Figure 15 : Structure globale de l'IIDMP. D'après Bricks, T. et al. [13].

Après 4 expérimentations majeures, des joints en PDMS sont coulés autour des connecteurs inférieurs permettant la connexion des biopuces au dispositif. Cette mesure permet de limiter la survenue de fuites ou une perte d'étanchéité.

2. Déroulement des expérimentations

Chaque expérimentation s'est déroulée sur 3 jours.

Dans une première étape, au jour 0 de l'expérimentation, les biopuces sont préparées par un dépôt de matrice extracellulaire à la surface des microcanaux. La fibronectine (Roche) diluée dans du PBS à une concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$ est utilisée lorsque les cellules hépatiques proviennent d'une lignée comme les HepG2 C3A. Par contre, lorsque des hépatocytes primaires humains sont utilisés le « coating » est effectué à l'aide de 60 $\mu\text{g/cm}^2$ de collagène (Collagen rat tail type 1, Pharmingen BD Biosciences) dilué dans du PBS. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la matrice extracellulaire est alors rincée à l'aide de milieu d'ensemencement dont la composition a été décrite précédemment. Les cellules hépatiques sont ensuiteensemencées dans les biopuces à une densité de 500 000 cellules/ cm^2 pour les HepG2 C3A et 250 000 cellules/ cm^2 pour les hépatocytes primaires humains. Le dispositif est

alors placé toute la nuit dans un incubateur à une température de 37 °C et sous une atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Cette phase correspond à la période d'adhésion des hépatocytes.

A l'issue de cette étape, le milieu d'ensemencement est remplacé par du milieu de culture (décrit précédemment pour les lignées et les hépatocytes primaires). Les Caco-2 TC7 préalablement cultivées et différenciées pendant 21 jours sur des inserts sont ensuite intégrées au dispositif, en apical du puits 1 de chaque unité. Avant toute perfusion et/ou exposition à des xénobiotiques des tests sont alors effectués sur les témoins (culture en Petri, en IDCCM et biopuces statiques) afin de caractériser la fonctionnalité et la viabilité des hépatocytes et Caco-2 TC7 avant qu'il n'y ait eu perfusion. A l'issue de ces tests et dans le cadre d'une exposition à des xénobiotiques, ceux-ci sont introduits en apical de la barrière intestinale. Le couvercle du dispositif est alors vissé et connecté à la pompe péristaltique par l'intermédiaire de tuyaux puis la perfusion est lancée pendant 24/48h à une vitesse de 25µl/min. Dans le cadre d'une cinétique, les prélèvements pourront alors être pratiqués aussi bien dans le compartiment intestinal qu'hépatique à l'aide de ports spécifiques situés sur le couvercle du dispositif. Grâce à cette méthode de prélèvement, il n'est pas nécessaire d'ouvrir le couvercle du dispositif pour effectuer des prélèvements de milieu de culture.

Après cette étape de perfusion et au jour 2 ou 3 de l'expérimentation, la pompe est arrêtée et le couvercle enlevé. Les Caco-2 TC7 placés dans les inserts et les HepG2 C3A ou hépatocytes primaires placés dans les microsystèmes sont alors détachés du dispositif afin d'effectuer tous les tests de fonctionnalité et viabilité nécessaires. De même, ces tests sont aussi pratiqués sur les témoins.

A l'issue de tous ces tests, les boîtiers sont nettoyés à l'eau milliQ, les tuyaux et les connecteurs à l'eau de javel et à l'eau milliQ, puis, tous ces éléments sont autoclavés. Les procédures de nettoyage des microsystèmes ont été décrites précédemment [19].

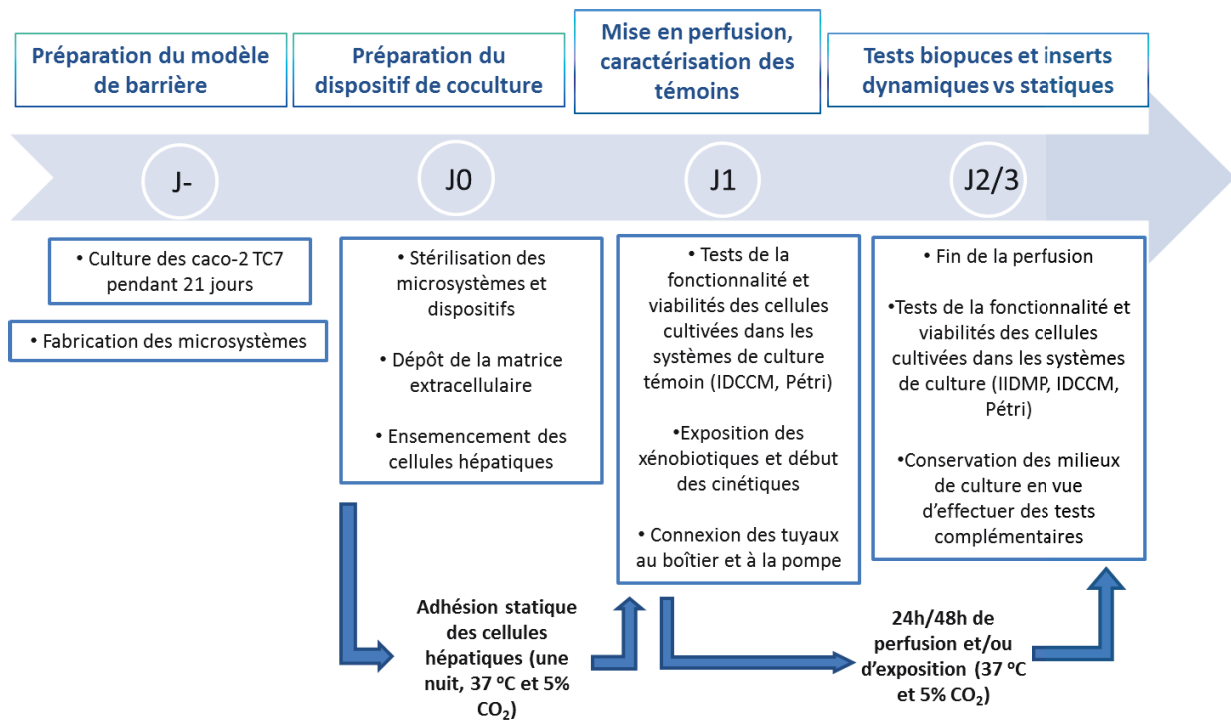


Figure 16 : Déroulement des expérimentations. D'après Bricks, T. et al. [13].

IV. PRÉPARATION DES TÉMOINS

Un certain nombre de témoins sont utilisés pour comparer les résultats obtenus avec l'IIDMP à ceux obtenus après coculture statique des hépatocytes et des Caco-2 TC7. De même, les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus après monoculture des hépatocytes en condition dynamique (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) et statique (boîte de Petri) ainsi qu'après monoculture des Caco-2 TC7 sur inserts. Ces témoins ont pour but de différencier l'impact du flux et de la coculture sur les deux types cellulaires cultivés au sein de l'IIDMP.

1. Coculture statique des TC7 et des HepG2 C3A

Cette coculture en boîte de Petri n'a été effectuée qu'avec des cellules issues de lignées, c'est-à-dire en associant la culture de Caco-2 TC7 à celle de HepG2 C3A. Cette coculture a été mise en place en suivant le protocole établi par Choi et al [199]. Les Caco-2 TC7 sont d'abord cultivées sur des membranes en polycarbonate (format plaque 6 puits, diamètre de 24 mm et pore de 0,4 μm , traité TC, Sigma Aldrich SA) à une densité de 100 000 cellules/ cm^2 pendant 21 jours de différenciation comme décrit précédemment. Les HepG2 C3A sont alorsensemencées au fond de plaque 6 puits à la même densité que celle utilisée au sein des microsystemes (250 000 cellules/ cm^2). Cet ensemencement n'a lieu qu'après avoir préparé la surface de ces puits à l'aide de fibronectine diluée à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans une solution de PBS. Après une nuit d'adhésion, les inserts sur lesquels sont cultivés les Caco-2 TC7 sont alors ajoutés dans les plaques 6 puits, en apical des HepG2 C3A. Ces inserts délimitent donc une partie apicale qui consiste en la culture de Caco-2 TC7 et une partie basale qui consiste en la culture des HepG2 C3A. Les milieux de culture utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour l'entretien classique et la culture des Caco-2 TC7 et des HepG2 C3A aussi bien en Petri que dans l'IIDMP.

2. IDCCM

La monoculture dynamique des hépatocytes (HepG2 C3A ou primaires humains) dans des microsystemes a été réalisée au sein d'un dispositif nommé IDCCM pour « Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems ». Ce dispositif développé antérieurement à l'IIDMP suit le même principe général d'utilisation que ce dernier, les biopuces sont connectées à

deux puits dans chacune des sous unités du dispositif et une pompe permet les prélèvements du deuxième puits vers le premier puits afin d'assurer la perfusion des microsystemes. La principale différence réside dans l'absence de barrière intestinale dans le cadre de l'IDCCM. Cette différence entraîne une différence de diamètre et donc du volume des puits de chacun de ces dispositifs : le volume total d'une sous unité de l'IIDMP est ainsi de 11 ml contre 4 ml (soit 2ml par puits) pour l'IDCCM. Du fait de la diminution de la taille de ces puits, il est possible de connecter 12 biopuces à un dispositif IDCCM contre 3 pour le dispositif IIDMP. Les microsystemes utilisés pour ces deux dispositifs sont les mêmes et l'ensemencement des cellules hépatiques se fait de la même façon dans les deux dispositifs (coating à la fibronectine, ensemencement de 250 000 HepG2 C3A/cm² ou 125 000 hépatocytes primaires/cm² dans chaque biopuces, flux de 25 µl/min).

Un autre contrôle a été réalisé et a consisté en la culture des hépatocytes au sein des microsystemes mais sans qu'il y ait perfusion. La préparation des biopuces a été exactement la même que celle effectuée dans le cadre de l'utilisation de l'IIDMP et de l'IDCCM. De même, les conditions de culture ont été identiques. La différence a résidé dans l'absence de perfusion de ces microsystemes.

3. Culture des Caco-2 TC7 en inserts et des hépatocytes primaires en Pétri

Des témoins consistant en la monoculture classique des Caco-2 TC7 sur membrane ont aussi été utilisés. Les conditions de culture d'entretien, d'ensemencement et de culture sur inserts de ces cellules ont été décrites précédemment (partie culture des lignées).

De même, des témoins consistant en la monoculture d'hépatocytes primaires humains au sein de boîte de Pétri ont été utilisés. Les milieux et conditions de culture ont été décrits précédemment (partie culture des hépatocytes primaires et milieux). Les puits des boîtes de Pétri sont préparés par un dépôt de 60 µg/cm² de collagène dilué dans du PBS. Après 1 heure minimum d'incubation à 37°C et dans une atmosphère enrichie de 5% de CO₂, le collagène est rincé et les puits préparés à l'aide de milieu d'ensemencement pour hépatocytes primaires décrit précédemment (HBM complémenté auquel 2% de FBS est additionné). Les deux cryotubes sont alors décongelés puis mélangés. Les hépatocytes primaires sont ensuite ensemencés au sein de boîtes de Pétri de format 12 puits à la même

densité que celle utilisée dans les microsystemes, soit 125 000 cellules/cm². Après une nuit d'adhésion, le milieu d'ensemencement est remplacé par du milieu de culture (HBM complémenté) dépourvu de FBS et les cellules exposées ou non aux xénobiotiques d'intérêt.

V. TESTS DE L'INTÉGRITÉ ET DE LA FONCTIONNALITÉ DE LA BARRIÈRE INTESTINALE ET DES CELLULES HÉPATIQUES

Afin de caractériser l'intégrité de la barrière intestinale avant et après coculture dynamique/culture statique et en l'absence ou non d'une exposition à des xénobiotiques, un certain nombre de tests ont été pratiqués.

1. Jaune Lucifer

Le Jaune Lucifer (Sigma) est une molécule fluorescente de petite taille et empruntant en priorité le passage paracellulaire lorsqu'il est exposé en apical de la barrière intestinale. Son flux est donc directement lié à l'état des jonctions serrées. Plus ce flux de l'apical vers le basal est faible, plus cela est indicateur de la bonne différenciation des jonctions et de leur jointivité. Pour suivre ce flux, le Jaune Lucifer a été exposé en apical de la barrière intestinale, dilué dans du HBSS et de l'Hepes (10 mM) à une concentration finale de 50 μ M. Le compartiment basal contenait uniquement du HBSS et de l'Hepes (10 mM). Les inserts exposés ont ensuite été mis dans un incubateur (37°C, 5% de CO₂) et sous agitation pendant 90 min. Les quantités de Jaune Lucifer résiduelles du compartiment apical et celles ayant été transportées dans le compartiment basal ont ensuite été mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (fluorimètre TECAN, Spectafluor plus, Magellan software) en utilisant une excitation de 485 nm et une émission de 530 nm.

Le flux de Jaune Lucifer a ensuite été exprimé par le calcul de la perméabilité apparente (P_{app} en m/s). Ce calcul fait intervenir :

- La quantité de Jaune Lucifer transportée en un temps donné dQ/dt (mol/sec)
- La concentration initiale de Jaune Lucifer de la solution apicale C_a (mol/m³)
- La surface de la membrane A (cm²) sur laquelle sont cultivées les Caco-2 TC7

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{A C_a}$$

Équation 1 : Calcul de la perméabilité apparente. D'après Bricks, T. et al. [13].

2. Résistance électrique transépithéliale (TEER)

La mesure de cette résistance est aussi proportionnelle à l'état des jonctions serrées. Au contraire du flux de Jaune Lucifer, plus la valeur de résistance est élevée, plus cela est indicatif d'une bonne différenciation et jointivité des jonctions serrées de la barrière

intestinale. Cette résistance a été mesurée à l'aide d'un ENDOHM (-24SNAP Chamber) adapté à l'utilisation d'inserts de format 6 puits.

La valeur de résistance électrique transépithéliale finale (TEER exprimée en $\Omega \cdot \text{cm}^2$) est ensuite calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$TEER = (R_m - R_b)A$$

Équation 2 : Calcul de la résistance transépithéliale. D'après Bricks, T. et al. [13].

- R_m est la résistance (Ω) obtenue après utilisation de l'ENDOHM
- R_b est la résistance (Ω) des inserts nus, sans qu'il y ait eu de culture de Caco-2 TC7
- A représente la surface (cm^2) des membranes sur lesquelles sont cultivées les Caco-2 TC7

3. Marqueurs des jonctions serrées

L'état des jonctions serrées des Caco-2 TC7 a aussi été caractérisé par immunomarquage. Les deux protéines des jonctions ciblées par les immunomarqueurs sont la claudine-1 et l'occludine. Les anticorps primaires correspondants sont des anticorps de lapin et l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre anti IgG de lapin (Alexia Fluor 488). Ces anticorps ont été achetés chez InVitrogen. Ce marquage a de plus été couplé à celui des noyaux des Caco-2 TC7 au DAPI. Le protocole de cet immunomarquage est décrit ci-dessous.

Après une étape de fixation avec une solution de paraformaldéhyde à 4%, les cellules ont été perméabilisées par du Triton (x100 BDH) dilué à 0,1% dans du PBS. Les sites non spécifiques ont ensuite été saturés avec du sérum de chèvre 3% pendant 10 minutes. La barrière intestinale a alors été exposée aux anticorps primaires dilués dans du PBS (1/100 pour l'occludine et 1/20 pour la claudine-1) et du sérum de chèvre 1% pendant 1h à 4°C. Après des étapes de rinçage au PBS, les membranes ont ensuite été rincées au PBS puis incubées pendant 1h dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire (1/100 pour l'occludine et 1/50 pour la claudine-1) dilué dans du PBS et du sérum de chèvre 1%. Après de nouvelles étapes de rinçage au PBS, l'observation et les captures d'images ont été effectuées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMI 6000B, LAS-AF software, Leica Microsystems, Nanterre, France).

4. Activité de la P-glycoprotéine

La rhodamine 123 (Sigma) est une molécule fluorescente et un substrat de la P-glycoprotéine (Pgp). Lorsqu'elle est exposée dans le compartiment basal de la barrière intestinale, cette molécule va être effluée vers le compartiment apical par la Pgp. Cette efflux va donc être proportionnel à l'activité de la Pgp.

Pour caractériser cette activité, la rhodamine 123 diluée à une concentration de 15µM dans du HBSS et de l'HEPES 1% est exposée en apical ou en basal de la barrière intestinale pour mesurer respectivement son flux du compartiment apical vers basal (A-B) et inversement (B-A). Les inserts exposés ont ensuite été placés dans un incubateur (37°C, 5% de CO₂) et mis sous agitation pendant 90 min. Les quantités de rhodamine 123 résiduelles du compartiment apical et basal ont ensuite été mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque (fluorimètre TECAN, Spectafluor plus, Magellan software) en utilisant une excitation de 485 nm et une émission de 530 nm.

Le ratio d'efflux (ER) de la rhodamine 123 a ensuite été calculé en divisant la perméabilité apparente (voir équation (1)) du basal vers l'apical ($P_{app\ B-A}$) par la perméabilité apparente de l'apical vers le basal ($P_{app\ A-B}$).

$$ER = \frac{P_{app\ B-A}}{P_{app\ A-B}}$$

Équation 3 : Calcul du ratio d'efflux de rhodamine 123. D'après Bricks, T. et al. [13].

5. Viabilité et activité des cellules hépatiques

Le nombre de cellules a été évalué sur des lames de Malassez avant ensemencement et à la fin de chacune des expérimentations après détachement des cellules à l'aide de trypsine 0,25% d'EDTA.

L'activité métabolique des HepG2 C3A cultivées dans les microsystèmes a aussi été évaluée par le test quantitatif au bleu d'Alamar (Fischer). Ce test permet de quantifier l'activité mitochondriale des cellules en mesurant la production de résorufine issue de la réduction de résazurine (bleu d'Alamar) par les mitochondries des cellules vivantes. Pour effectuer ce test, les HepG2 C3A cultivées dans les microsystèmes ont été exposées à 300 µl de bleu d'Alamar dilué à 1/10 pendant 1h dans un incubateur (37°C, 5% CO₂). La quantité de

résofurine produite dans chacun des échantillons a ensuite été mesurée par un lecteur de plaque fluorescent à 530 nm d'excitation et 595 nm d'émission (fluorimètre TECAN, Spectafluor plus, Magellan software). Les résultats ont ensuite été exprimés en intensité de fluorescence et normalisés par le nombre de cellules restantes à la fin des expérimentations.

La viabilité des HepG2 C3A et des hépatocytes primaires a aussi été évaluée qualitativement que ce soit dans le cadre de la culture des hépatocytes au sein de boîtes de Pétri et des microsystèmes. Pour cela, les cellules vivantes ont été marquées à la Calcéine AM et les cellules mortes à l'iodure de Propidium (IP) (Molecular Probes).

Ces deux marqueurs ont été préparés dans du PBS (dilution 1/500 pour la Calcéine et 1/200 pour l'IP) et ont été incubés en présence des cellules hépatiques pendant 15 min à 37°C, dans une atmosphère enrichie avec 5% de CO₂ et à l'abri de la lumière. Les cellules hépatiques ont ensuite été rincées au PBS avant leur observation au microscope à fluorescence (Leica DMI 6000B, LAS-AF software, Leica Microsystems, Nanterre, France).

La production d'albumine par les cellules hépatiques est un autre marqueur indicatif de la fonctionnalité de ces cellules. Cette synthèse a été mesurée à l'aide d'un test ELISA classique en utilisant des anticorps anti albumine humaine couplés ensuite à l'activité d'une peroxydase. La technique utilisée a été décrite en détail dans un des articles publiés par des membres du laboratoire ayant mis au point l'IDCCM [19].

VI. ACTIVITÉ DU MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES DES CELLULES INTESTINALES ET HÉPATIQUES

1. Activité d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phase I.

1.1. EROD

L'activité du CYP1A1 des HepG2 C3A a été quantifiée à l'aide du test EROD. Ce test se base sur le métabolisme de l'éthoxyrésorufine (ERES) par l'éthoxyrésorufine-o-dééthylase (CYP1) en une molécule fluorescente, la résorufine [200].

Ce substrat est dilué dans du milieu de culture à une concentration finale de 10 μ M et mixé avec de la salycilamide (3 μ M), une molécule qui inhibe les enzymes de phase II potentiellement aptes à métaboliser la résorufine. Les HepG2 C3A cultivées en microsystemes ont ensuite été exposées à 300 μ l de cette préparation contre 500 μ l lorsqu'elles étaient cultivées en boîte de Pétri. Cette période d'incubation a duré 1h à 37°C, sous une atmosphère enrichie de 5 % CO₂ et dans l'obscurité. La quantité de résorufine produite dans chacun des échantillons a ensuite été mesurée par un lecteur de plaque fluorescent à 530 nm d'excitation et 595 nm d'émission (fluorimètre TECAN, Spectafluor plus, Magellan software). Les résultats ont ensuite été exprimés en intensité de fluorescence et normalisés par le nombre de cellules restantes à la fin des expérimentations.

1.2. Phénacétine et oméprazole

La phénacétine (Sigma) est une molécule métabolisée par le CYP1A2 en paracétamol. Afin de mesurer son métabolisme, la phénacétine a été diluée dans le milieu de culture pour atteindre une concentration finale de 100 μ M.

L'oméprazole (Sigma) est une molécule métabolisée par le CYP2C19 et le CYP3A4 des cellules en 5-OH oméprazole et en oméprazole sulfone. Cette molécule a été utilisée à une concentration initiale de 30 μ M.

La phénacétine a été utilisée aussi bien dans des conditions de culture dynamiques (IIDMP, IDCCM) que statiques (Pétri, inserts), en utilisant des lignées (Caco-2 TC7 et HepG2 C3A) et des hépatocytes primaires. Au contraire, l'oméprazole n'a été testé que sur des

cultures d'hépatocytes primaires humains en IIDMP, IDCCM, Petri et sur des Caco-2 TC7 en inserts.

La production des métabolites de la phénacétine et de l'oméprazole a été exprimée en ratio de la quantité de produit initial (MR).

$$MR (\%) = \frac{\text{Quantity of metabolites (nmoles)}}{\text{Quantity of initial substrate (nmoles)}} \times 100$$

Équation 4 : calcul du ratio métabolique. D'après Bricks, T. et al. [13].

Les expositions ont été effectuées en apical non seulement de la barrière intestinale dans l'IIDMP, mais aussi de la monoculture des Caco-2 TC7 et dans le cadre de la coculture des Caco-2 TC7 et des HepG2 C3A en boîte de Pétri. Dans les autres configurations (IDCCM et Pétri), les hépatocytes ont directement été exposés à la phénacétine. L'apparition des métabolites a été suivie dans les deux compartiments délimités par la barrière intestinale (IIDMP, coculture statique, monoculture des Caco-2 TC7) et dans les puits au contact des cellules hépatiques (IDCCM et Pétri). Le volume des prélèvements était de 100 µl en apical des Caco-2 TC7 (inserts et cocultures) et dans les boîtes de Pétri (monoculture des hépatocytes) ainsi que de 150 µl en basal des Caco-2 TC7 (inserts et IIDMP) et dans l'IDCCM. Ces prélèvements ont ensuite été congelés à -20 °C puis stockés à -80°C.

1.3. Mesure de l'adsorption

L'adsorption des molécules et de leurs métabolites a aussi été mesurée dans les dispositifs de culture (IDCCM et IIDMP) et témoins utilisés (Pétri, inserts). Pour cela, les configurations de culture étaient exactement les mêmes mais aucune cellule n'avait été introduite initialement dans les dispositifs. Les quantités de phénacétine et de paracétamol (Sigma) ainsi que d'oméprazole (Sigma), de 5-OH oméprazole et d'oméprazole sulfone (Artmolecule) restantes ont été exprimées en fonction de la quantité de produits introduits initialement. Ces quantités résiduelles ont été mesurées dans les différents compartiments des dispositifs et témoins utilisés. Les valeurs d'adsorption ont été calculées en pourcentage de la quantité initiale de produits introduits.

$$Q_{ads} (\%) = \sum_{1h}^{24h} (C(t) \times V(t + dt) - C(t + dt) \times V(t + dt)) / Q_i$$

Équation 5 : calcul du ratio de la quantité de molécules adsorbées entre 1h et 24h d'exposition.

- Q_{ads} est la quantité de molécules adsorbées par les systèmes de culture (IDCCM, IIDMP et Pétri) et exprimée en pourcentage de la quantité initiale de substrats introduite dans le dispositif.
- C (t) et C (t+dt) sont les concentrations des molécules d'intérêt au temps t et t+dt (μM).
- V(t) et V(t+dt) sont les volumes de culture dans lesquels étaient diluées les molécules testées au temps t et t+dt (ml).
- Q_i est la quantité initiale de molécules introduites au temps 0 de l'expérimentation (nmoles).

2. Calcul des clairances intrinsèques de l'oméprazole et de la phénacétine

Afin de comparer au mieux les performances métaboliques des hépatocytes et cellules intestinales cultivées au sein du dispositif de coculture (IIDMP), les clairances *in vivo* de l'oméprazole et de la phénacétine ont été calculées à l'aide d'un modèle de pharmacocinétique (PK) mis en place en partenariat avec le professeur Frédéric Bois et le docteur Jérémy Hamon. Afin d'identifier un éventuel effet dû au mode de culture et de mettre en évidence de potentielles interactions intestin/foie, les clairances de la phénacétine et de l'oméprazole obtenues à partir de 4 configurations de culture ont été comparées les unes aux autres.

2.1. Culture des Caco-2 TC7 et des hépatocytes au sein de l'IIDMP et des Caco-2 TC7 en monoculture

Le calcul des clairances intrinsèques propres à l'utilisation de l'IIDMP s'est fait en se basant sur le schéma global de fonctionnement du dispositif suivant :

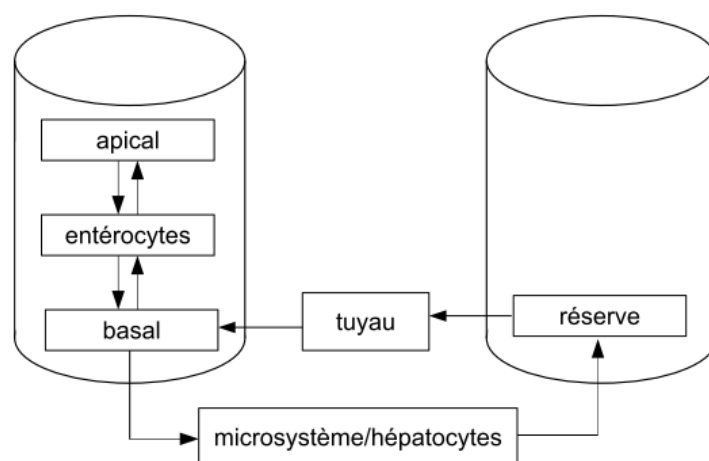


Figure 17: Représentation schématique du modèle PK associé au calcul des clairances intrinsèques propres à l'utilisation de l'IIDMP.

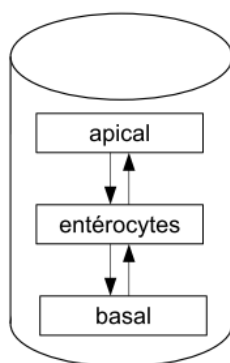


Figure 18: Représentation schématique du modèle PK associé à la culture des Caco-2 TC7 en monoculture.

Un modèle de pharmacocinétique (PK) a été utilisé afin de calculer les clairances intrinsèques associées au métabolisme de la phénacétine en paracétamol et de l'oméprazole en 5 OH omeprazole et omeprazole sulfone par les Caco-2 TC7 (en coculture et monoculture) ainsi que par les hépatocytes primaires humains cultivés au sein de l'IIDMP. Dans ce cadre, le boîtier IIDMP a été décrit par un modèle à 6 compartiments (Figure 17) tandis que la monoculture de Caco-2 TC7 a été décrite par un modèle à 3 compartiments (Figure 18). Les équations utilisées pour décrire la distribution et le métabolisme des substrats par les Caco-2 TC7 ont été les mêmes que l'on se place dans le cadre de la coculture au sein de l'IIDMP ou de la monoculture des Caco-2 TC7. L'adsorption et la désorption des substrats utilisés ont

aussi été prises en compte dans l'utilisation des données obtenues expérimentalement en l'absence de cellules. Par souci de simplification, l'adsorption des composés par le sérum utilisé ainsi que par l'albumine produite par les hépatocytes a été calibrée en fonction des résultats obtenus lors des expérimentations pratiquées sans cellules mais avec de la BSA. C'est pour cela que la fraction non adsorbée $f_{u,med}$ a été fixée à 1. Nous avons aussi fait l'hypothèse d'un métabolisme linéaire aux doses utilisées lors des expérimentations. Les équations différentielles utilisées pour décrire ces deux modèles ont donc été les suivantes :

$$\frac{dQ_{R1a}(t)}{dt} = CLc \times (C_{caco}(t) - C_{R1a}(t)) - F_b C_{R1a}(t) + k_u Q_{ADS(R1a)}(t) \quad \text{Équation 6}$$

$$\frac{dQ_{caco}(t)}{dt} = CLc \times (C_{R1a}(t) + C_{R1b}(t) - 2 \times C_{caco}(t)) - f_{u,med} \sum CL_{int,invitro,MET=i} C_{caco}(t) \quad \text{Équation 7}$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{R1b}(t)}{dt} = & CLc \times (C_{caco}(t) - C_{R1b}(t)) + F \times (C_{Tb}(t) - C_{R1b}(t)) \\ & - F_b C_{R1b}(t) + k_u Q_{ADS(R1b)}(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \end{aligned} \quad \text{Équation 8}$$

$$\frac{dQ_{HepB}(t)}{dt} = F \times (C_{R1b}(t) - C_{HepB}(t)) - f_{u,med} \sum CL_{int,invitro,MET=i} C_{HepB}(t) \quad \text{Équation 9}$$

$$\frac{dQ_{R2}(t)}{dt} = CLc \times (C_{HepB}(t) - C_{R2}(t)) - F_b C_{R2}(t) + k_u Q_{ADS(R2)}(t) \quad \text{Équation 10}$$

$$\frac{dQ_{Tb}(t)}{dt} = F \times (C_{R2}(t) - C_{Tb}(t)) - F_b C_{Tb}(t) + k_u Q_{ADS(Tb)}(t) \quad \text{Équation 11}$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{ADS}(t)}{dt} = & F_b \times (C_{R1a}(t) + C_{R1b}(t) + C_{R2}(t) + C_{Tb}(t)) \\ & - k_u \times (Q_{ADS(R1a)}(t) + Q_{ADS(R1b)}(t) + Q_{ADS(R2)}(t) + Q_{ADS(Tb)}(t)) \end{aligned} \quad \text{Équation 12}$$

Les termes utilisés ont été les suivants :

- CLc représente la vitesse de diffusion des molécules à travers la barrière formée par les Caco-2 TC7 ($\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$). CLc est liée à la vitesse d'équilibration des molécules testées et produites (métabolites CLmet) de part et d'autre de la barrière intestinale.
- R1a, R1b, R2, HepB, Tb correspondent respectivement aux deux réservoirs (avec une partie apicale et basale pour le réservoir 1, R1), à la biopuce hépatique (HepB) et au compartiment décrivant le comportement des tuyaux (Tb) (Figure 17).
- F représente le flux de milieux de culture fixé à une vitesse de $25\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$.

- C_i est la concentration du compartiment i ($\mu\text{mol. L}^{-1}$).
- Q_i est la quantité de molécules dans le compartiment i (μmol).
- C_i et Q_i sont liés par le volume V_i avec $C_i = Q_i / V_i$.
- Cl_{int} , *in vitro* représente la clairance estimée par le modèle en L.s^{-1} .
- f_{umed} est la fraction non adsorbée au milieu de culture et fixée à 1.
- $Q_{ADS}(R1a)$, $Q_{ADS}(R1b)$, $Q_{ADS}(R2)$ et $Q_{ADS}(Tb)$ sont les quantités de molécules adsorbées par les dispositifs (μmol).
- F_b (L.s^{-1}) et k_u (s^{-1}) sont les taux d'adsorption/désorption non spécifiques sur les matériaux composant les tuyaux, systèmes de culture, microsystèmes...etc. Ils sont estimés par le modèle.
- $\frac{dQ_{lost}(t)}{dt}$ est l'équation permettant d'inclure dans le modèle d'éventuelles pertes de molécules dues aux prélèvements ou encore aux phénomènes de métabolismes secondaires.

Les cinétiques des métabolites ont été décrites avec un modèle similaire. Pour un métabolite (MET), le modèle correspondant est le suivant :

$$\frac{dQ_{R1, Met}(t)}{dt} = F \times (C_{T, Met}(t) - C_{R1, Met}(t)) - F_{b, Met} C_{R1, Met}(t) + k_{u, Met} Q_{ADS(R1, Met)}(t) \quad \text{Équation 13}$$

$$\frac{dQ_{caco, Met}(t)}{dt} = CLc_{Met} \times (C_{R1a, Met}(t) + C_{R1b, Met}(t) - 2 \times C_{caco, Met}(t)) + f_{umed} CL_{int, invitro, Met} C_{caco, Met}(t) \quad \text{Équation 14}$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{R1b, Met}(t)}{dt} = & CLc_{Met} \times (C_{caco, Met}(t) - C_{R1b, Met}(t)) + F \times (C_{Tb, Met}(t) - C_{R1b, Met}(t)) \\ & - F_{b, Met} C_{R1b, Met}(t) + k_u Q_{ADS(R1b, Met)}(t) - \frac{dQ_{lost, Met}(t)}{dt} \end{aligned} \quad \text{Équation 15}$$

$$\frac{dQ_{R2, Met}(t)}{dt} = F \times (C_{HepB, Met}(t) - C_{R2, Met}(t)) - F_{b, Met} C_{R2, Met}(t) + k_{u, Met} Q_{ADS(R2, Met)}(t) \quad \text{Équation 16}$$

$$\frac{dQ_{Tb, Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R2, Met}(t) - C_{Tb, Met}(t)) - F_{b, Met} C_{Tb, Met}(t) + k_{u, Met} Q_{ADS(Tb, Met)}(t) \quad \text{Équation 17}$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{ADS, Met}(t)}{dt} = & F_{b, Met} \times (C_{R1a, Met}(t) + C_{R1b, Met}(t) + C_{R2, Met}(t) + C_{Tb, Met}(t)) \\ & - k_{u, Met} \times (Q_{ADS(R1a, Met)}(t) + Q_{ADS(R1b, Met)}(t) + Q_{ADS(R2, Met)}(t) + Q_{ADS(Tb, Met)}(t)) \end{aligned} \quad \text{Équation 18}$$

2.2. Culture des hépatocytes au sein de l'IDCCM et en boîtes de Pétri

Afin de caractériser l'effet de la perfusion sur les hépatocytes cultivés au sein des microsystèmes, un des témoins utilisé consistait en la monoculture de ces cellules dans le dispositif décrit précédemment et appelé IDCCM. Le schéma du modèle PK associé au fonctionnement de ce dispositif est le suivant :

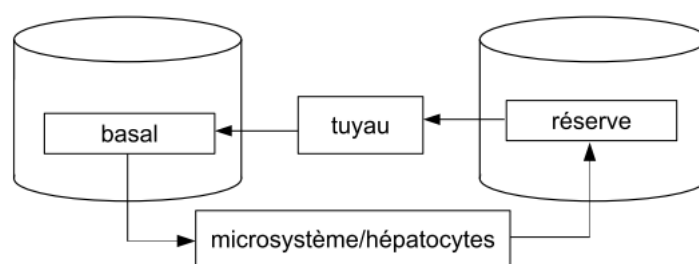


Figure 19 : Représentation schématique du modèle PK associé à l'utilisation de l'IDCCM.

Un autre témoin a aussi été utilisé et a consisté en la monoculture d'hépatocytes en boîtes de Pétri. Ce témoin a été décrit par le schéma suivant.

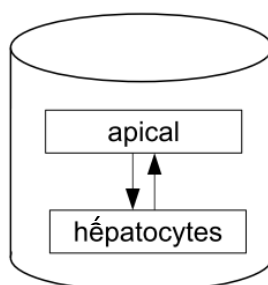


Figure 20 : Représentation schématique du modèle PK associé à la culture des hépatocytes en boîtes de Pétri.

Un modèle de pharmacocinétique similaire au précédent a été utilisé afin de calculer les clairances intrinsèques *in vitro* associées au métabolisme de la phénacétine et de l'oméprazole par les deux monocultures d'hépatocytes témoins. Le dispositif IDCCM a été décrit par un modèle à 4 compartiments (Figure 19) alors que la simple culture en boîte de Pétri a été décrite par un modèle à deux compartiments (Figure 20). De la même manière que décrit précédemment, l'adsorption et la désorption des composés entraînées aussi bien par les matériaux des boîtes de Pétri que de l'IDCCM ont été incluses à partir de résultats

expérimentaux obtenus en l'absence de cellules. De même, la fraction non adsorbée $f_{u,med}$ a été fixée à 1 et le métabolisme considéré comme linéaire aux doses utilisées. Les équations finalement retenues ont été les suivantes

$$\frac{dQ_{R1}(t)}{dt} = F \times (C_{Tb}(t) - C_{R1}(t)) - F_b C_{R1}(t) + k_u Q_{ADS(R1)}(t) \quad \text{Équation 19}$$

$$\frac{dQ_{HepB}(t)}{dt} = F \times (C_{R1}(t) - C_{HepB}(t)) - f_{u,med} \sum CL_{in\, vitro, MET=i} C_{HepB}(t) \quad \text{Équation 20}$$

$$\frac{dQ_{R2}(t)}{dt} = F \times (C_{HepB}(t) - C_{R2}(t)) - F_b C_{R2}(t) + k_u Q_{ADS(R2)}(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \quad \text{Équation 21}$$

$$\frac{dQ_{Tb}(t)}{dt} = F \times (C_{R2}(t) - C_{Tb}(t)) - F_b C_{Tb}(t) + k_u Q_{ADS(Tb)}(t) \quad \text{Équation 22}$$

$$\frac{dQ_{ADS}(t)}{dt} = F_b \times (C_{R1}(t) + C_{R2}(t) + C_{Tb}(t)) - k_u \times (Q_{ADS(R1)}(t) + Q_{ADS(R2)}(t) + Q_{ADS(Tb)}(t)) \quad \text{Équation 23}$$

- R1, R2, HepB, Tb correspondent aux deux réservoirs du dispositif, à la biopuce hépatique et aux tuyaux utilisés pour assurer la perfusion (Figure 19).
- F est la vitesse de perfusion du milieu de culture fixée à $25\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$.
- C_i est la concentration du compartiment i ($\mu\text{mol}.\text{L}^{-1}$).
- Q_i est la quantité de molécules dans le compartiment i (μmol).
- C_i et Q_i sont liés par le volume V_i avec $C_i = Q_i/V_i$.
- $Cl_{int, in\, vitro}$ représente la clairance estimée par le modèle en $\text{L}.\text{s}^{-1}$.
- $f_{u,med}$ est la fraction non adsorbée au milieu de culture et fixée à 1.
- $Q_{ADS(R1)}$, $Q_{ADS(R2)}$ et $Q_{ADS(Tb)}$ sont les quantités de molécules adsorbées par les dispositifs (μmol).
- F_b ($\text{L}.\text{s}^{-1}$) et k_u (s^{-1}) sont les taux d'adsorption/désorption non spécifiques sur les matériaux composant les tuyaux, systèmes de culture, microsystèmes...etc. Ils sont estimés par le modèle.
- $\frac{dQ_{lost}(t)}{dt}$ est l'équation permettant d'inclure dans le modèle d'éventuelles pertes de molécules dues aux prélèvements ou encore aux phénomènes de métabolismes secondaires.

Les cinétiques des métabolites ont été décrites avec un modèle similaire. Pour un métabolite (MET), le modèle correspondant est le suivant :

$$\frac{dQ_{R1,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{Tb,Met}(t) - C_{R1,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R1,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(R1,Met)}(t) \quad \text{Équation 24}$$

$$\frac{dQ_{HepB,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R1,Met}(t) - C_{HepB,Met}(t)) + fu_{med,Met} CL_{int, in vitro, Met} \times C_{HepB}(t) \quad \text{Équation 25}$$

$$\frac{dQ_{R2,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{HepB,Met}(t) - C_{R2,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R2,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(R2,Met)}(t) - \frac{dQ_{lost,Met}(t)}{dt} \quad \text{Équation 26}$$

$$\frac{dQ_{Tb,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R2,Met}(t) - C_{Tb,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{Tb,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(Tb,Met)}(t) \quad \text{Équation 27}$$

$$\frac{dQ_{ADS,Met}(t)}{dt} = F_{b,Met} \times (C_{R1,Met}(t) + C_{R2,Met}(t) + C_{Tb,Met}(t)) - k_{u,Met} \times (Q_{ADS(R1,Met)}(t) + Q_{ADS(R2,Met)}(t) + Q_{ADS(Tb,Met)}(t)) \quad \text{Équation 28}$$

En ce qui concerne la monoculture des hépatocytes en boîtes de Pétri, les équations suivantes ont été utilisées :

$$\frac{dQ_P(t)}{dt} = -F_b C_P(t) + k_u Q_{ads}(t) - fu_{med} \sum CL_{int,invitro,MET=i} C_P(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \quad \text{Équation 29}$$

$$\frac{dQ_{ads}(t)}{dt} = F_b C_P(t) - k_u Q_{ads}(t) \quad \text{Équation 30}$$

$$\frac{dQ_{P,MET}(t)}{dt} = -F_{b,MET} C_{b,MET}(t) + k_{u,MET} Q_{ads,MET}(t) + fu_{med} CL_{int,invitro,MET} C_b(t) \quad \text{Équation 31}$$

$$\frac{dQ_{ads,MET}(t)}{dt} = F_{b,MET} C_{P,MET}(t) - k_{u,MET} Q_{ads,MET}(t) \quad \text{Équation 32}$$

- P correspond au réservoir unique formé par la boîte de Pétri et MET aux métabolites.

2.3. Estimation des paramètres et méthodes statistiques

Afin de respecter la stœchiométrie, la résolution du système d'équations différentielles a été réalisée en utilisant des quantités en mole. Les constantes d'adsorption et résorption (F_b , k_u) ainsi que les clairances (CL_X) ont été estimées et optimisées en utilisant les données expérimentales.

Les paramètres du modèle de PK *in vitro* ont été calibrés dans un cadre d'inférence bayésienne [201,202]. Une distribution non informative (vague) a été utilisée pour définir la

distribution a priori des paramètres. La vraisemblance des données a été choisie comme suivant une distribution log-normale centrée sur les prédictions du modèle. Les distributions a posteriori des paramètres ont été obtenues en utilisant un échantillonnage MCMC (Monte Carlo par Chaînes de Markov). Pour tous les paramètres, la convergence a été évaluée en calculant le critère de Gelman et Rubin sur les 200,000 dernières itérations de chaque chaîne.

Les simulations permettant la calibration des paramètres et celles utilisées pour réaliser des prédictions ont été réalisées avec GNU MCSim v5.4.0. Le logiciel R, version 2.15.1 a été utilisé pour la réalisation de tous les graphiques.

2.4. Calcul des biodisponibilités hépatiques

Les clairances intrinsèques ($CL_{int, vivo}$) associées à la situation *in vivo* ont été calculées à partir des clairances intrinsèques ($CL_{int, vitro}$) obtenues à l'aide du modèle PK et des expérimentations *in vitro*. Dans ce but, un facteur d'échelle (SF) a été utilisé afin d'exprimer les clairances en ml/min/kg de masse corporelle. Le nombre d'hépatocytes par gramme de foie a été estimé à 99×10^6 [203] et le poids du foie à 25 grammes par kilogramme de masse corporelle [204]. Le facteur d'échelle a été défini comme le produit de ces deux valeurs et fixé à 2475×10^6 hépatocytes par kilogramme de masse corporelle. Les clairances intrinsèques *in vitro* correspondantes ont été calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$CL_{int, vivo} = CL_{int, vitro} SF \quad \text{Équation 33}$$

Ces clairances intrinsèques *in vivo* ont finalement été converties en clairances hépatiques *in vivo* ($CL_{h, vivo}$) à l'aide de modèles s'appuyant sur des paramètres comme le débit sanguin du foie Q_H fixé à 20ml/min/kg de masse corporelle [205, 206]. Les paramètres f_{ub} et f_{med} décrivant la fraction non adsorbée de substrats et métabolites dans le sang ont été fixés à 1 comme décrit précédemment. Le modèle « well-stirred » [207] a été utilisé et consistait en l'équation suivante :

$$CL_{h, vivo} = \frac{Q_H \times \frac{f_{ub}}{f_{med}} \times CL_{int, vitro} \times SF}{Q_H + \frac{f_{ub}}{f_{med}} \times CL_{int, vitro} \times SF} \quad \text{Équation 34}$$

La biodisponibilité hépatique a été calculée à l'aide de l'équation reportée ci-dessous [208].

$$Fh = 1 - \frac{CLh_{in vivo}}{Q_H} \quad \text{Équation 36}$$

$CLh_{in vivo}$ est la clairance hépatique calculée dans l'équation 35 et Q_H est le débit sanguin hépatique décrit précédemment.

2.5. Calcul des biodisponibilités intestinales

La clairance intestinale intrinsèque calculée par le modèle a été convertie en clairance intrinsèque *in vivo* à l'aide d'un facteur d'échelle appelé SF2. Ce facteur correspond au produit de la masse d'intestin par kg de masse corporelle (7,5 g selon les résultats de Lin et al en 1999 [209]) et du nombre d'entérocytes par gramme d'intestin (estimé à 250×10^6 pour 0,685 g d'intestin [208]).

$$CL_{gut, int, in vivo} = CL_{gut, int, in vitro} SF2 \quad \text{Équation 37}$$

La biodisponibilité intestinale (Fg) a été calculée à l'aide de deux équations provenant de la littérature [208]. Q_{gut} est un paramètre calculé à l'aide du débit sanguin intestinal (fixé à 18 L/h) et de la clairance (CLc) associée à la perméabilité des entérocytes aux molécules testées [210]. Cette clairance a été calculée par le modèle PK (équation 6).

$$Q_{gut} = \frac{CLc \times SF2 \times Q_{ent}}{Q_{ent} + CLc \times SF2} \quad \text{Équation 38}$$

$$Fg = \frac{Q_{gut}}{Q_{gut} + fu_{gut} \times CL_{gut, int, in vivo}} \quad \text{Équation 39}$$

fu_{gut} représente la fraction de molécules non adsorbées par le compartiment intestinal et a été fixée à 1 [208].

2.6. Calcul des biodisponibilités orales

Après avoir calculé la biodisponibilité intestinale (F_g) et la biodisponibilité hépatique (F_h), les biodisponibilités orales ont été calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$F_{oral} = F_{abs} \times F_g \times F_h \quad \text{Équation 40}$$

F_{abs} correspond à la fraction de molécules absorbée par l'intestin. Cette fraction a été fixée à 1 pour l'oméprazole et 0,91 pour la phénacétine, en accord avec la littérature [211].

VII. ANALYSE STATISTIQUE

Au moins trois expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque condition testée en utilisant à chaque fois trois réplicats. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écarts types. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de tests ANOVA pour les comparaisons multiples et de tests de Student pour les comparaisons simples en utilisant le logiciel GraphPad (Prism 6). Une p-value < 0.05 a été considérée comme significative et le degré de significativité a été annoté sur les histogrammes et courbes (*, **, ***, **** pour des p-value inférieures à 0.05; 0.025; 0.001 and 0.0001 respectivement).

CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA FAISABILITE DU DISPOSITIF DE COCULTURE INTESTIN/FOIE INTEGRANT DES CELLULES INTESTINALES ET HEPATIQUES DE LIGNEES

Afin de tester la faisabilité du dispositif de coculture IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform), nous avons utilisé dans une première étape des cellules intestinales et hépatiques de lignée. En effet, même si ces cellules présentent une faible activité basale des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), elles sont robustes, faciles d'utilisation, peu coûteuses et permettent d'obtenir des résultats peu variables. C'est pour cela que ce type de cellules est bien souvent utilisé lors des premières phases de développement de dispositifs de culture que ce soit dans le cadre de tests de toxicité ou de biocompatibilité [212].

Notre choix s'est porté d'une part, sur des cellules intestinales de lignée, les Caco-2 TC7 comme barrière intestinale et d'autre part, sur des cellules hépatiques de lignée, les HepG2 C3A comme modèle de culture au sein des microsystèmes.

Le choix de ces deux types cellulaires a été déterminé par leurs propriétés spécifiques [13]. Ainsi, les Caco-2 TC7 présentent une plus grande homogénéité et une plus petite résistance transépithéliale que sa lignée parente, les Caco-2 [116]. Elles conservent, de plus, les propriétés initiales des Caco-2 qui en font un des modèles d'étude de référence de la barrière intestinale comme la mise en place d'une barrière polarisée présentant des structures similaires aux microvillosités ou encore la différenciation de jonctions serrées [110].

En ce qui concerne les HepG2 C3A, ces cellules ont été choisies car préalablement caractérisées et utilisées au sein du laboratoire de biomécanique et bioingénierie (BMBl) notamment dans le cadre de la culture dynamique au sein d'un autre dispositif appelé IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) [11,19]. Il avait ainsi été montré que certaines EMX de ces cellules présentaient une activité métabolique plus importante lorsqu'elles étaient cultivées dans ces conditions de culture que lorsqu'elles étaient cultivées de façon classique et statique en boîtes de Pétri [11]. En particulier, cette augmentation

d'activité à la fois en termes de régulation génique (quantité d'ARNm) et en termes d'activité enzymatique avait été montrée en ciblant les CYP1A [11,19].

Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de condition dynamique de culture en microsystemes associée à celle d'une coculture intestin/foie sur la viabilité et fonctionnalité de ces deux types cellulaires ainsi que sur l'activité des CYP1 des HepG2 en utilisant deux molécules substrats de ces enzymes : l'éthoxyrésorufine et la phénacétine. Cette configuration de coculture (Caco-2 TC7/HepG2 C3A) nous a permis de suivre le transport d'une molécule comme la phénacétine, suivi de son métabolisme hépatique ainsi que d'éventuelles interactions de type intestin/foie. Pour distinguer l'effet de la perfusion de l'effet des interactions intestin/foie, les caractéristiques des deux types cellulaires ont été comparées à celles : de cellules cultivées en boîte de Pétri (Caco-2 TC7 sur inserts et HepG2 au fond de puits de culture), de HepG2 cultivées dans des microsystemes et perfusées mais sans qu'il y ait coculture et d'une coculture statique (Caco-2 TC7/HepG2) en boîte de Pétri.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette première étude du fonctionnement du dispositif ont été détaillés dans la publication intitulée « Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines » [13] et ajoutée dans la suite de ce manuscrit.

DEVELOPMENT OF A NEW MICROFLUIDIC PLATFORM INTEGRATING CO-CULTURES OF INTESTINAL AND LIVER CELL LINES

**Thibault Bricks ^a, Patrick Paullier ^a, Audrey Legendre^a, Marie-José Fleury ^a,
Perrine Zeller ^a, Franck Merlier ^b, Pauline M. Anton^c, Eric Leclerc ^{a, *}**

^a CNRS-UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Université de Technologies de Compiègne, France

^b CNRS FRE 3580, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, Université de Technologies de Compiègne, France

^c EGEAL, Institut Polytechnique Lasalle Beauvais, France

Corresponding author: Eric Leclerc, laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie,
Université de Technologie de Compiègne, France
Tel: 33 (0)3 44 23 7943. E-mail: eric.leclerc@utc.fr

ABSTRACT

We developed a new biological model to mimic the organ-organ interactions between the intestine and the liver. We coupled polycarbonate cell culture inserts and microfluidic biochips in an integrated fluidic platform allowing dynamic co-cultures (called IIDMP for Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform). The intestinal compartment was simulated using Caco-2 TC7 cells and the liver one by HepG2 C3A. We showed that Caco-2 TC7 viability, barrier integrity and functionality (assessed by paracellular and active transport), were not altered during co-cultures in the bioreactor in comparison with the conventional insert Petri cultures. In parallel, the viability and metabolism of the HepG2 C3A cells were maintained in the microfluidic biochips. Then, as proof of concept, we used the bioreactor to follow the transport of phenacetin through the intestinal barrier and its metabolism into paracetamol by the CYP1A2 of the HepG2 C3A cells. Our results demonstrated the performance of this bioreactor with cell co-cultures compared to static co-culture controls in which weak biotransformation into paracetamol was detected. Our study illustrated the interest of such a bioreactor combining the advantages of a cell culture barrier and of liver microfluidic cultures in a common framework for *in vitro* studies.

Keywords: co-cultures, microfluidic biochips, Caco-2 TC7, HepG2 C3A, phenacetin, drug screening

1. INTRODUCTION

The use of new *in vitro* methods to understand and investigate the metabolism and toxicity of drugs increased considerably in the last few years (Lau et al., 2004). Indeed, these methods can allow the culture of cells in controlled environments mimicking the *in vivo* microenvironment (Inamdar and Borenstein, 2011). Then, they can be used to predict the toxicity and metabolism of drugs with a higher reliability than traditional *in vitro* methods (Bhogal et al., 2005). Their uses should be also linked to a decrease in the number of preclinical tests and the probability of unforeseen toxicity during the drug discovery steps. In addition, they can be used to generate various types of data (genomics, physiological based kinetics) for integration into complex and relevant *in silico* complex framework (Blaauboer, 2003).

Traditionally, *in vitro* methods are based on static cell cultures in plates or Petri dishes. These methods provide a simple, accessible interface for testing the metabolism and toxicity of molecules. However, they are not able to mimic the complexity of *in vivo* situations such as organ complexity or organ-organ interactions. In this context, numerous new *in vitro* methods have been developed to open the possibility to cultivate cells in three dimensional environments and/or dynamic conditions under a controlled flow of culture medium (Sweeney et al., 1995; Shuler et al., 1996; Chang and Hughes-Fulford, 2009; Inamdar and Borenstein, 2011; Ghaemmaghami et al., 2012). These types of culture have been associated with better functionality and viability of the cells (Kim et al., 2012; Xu et al., 2012). In addition to these *in vitro* methods, the use of microfluidic biochips are able to reproduce several physiological features such as the cellular microenvironment, dynamic conditions found *in vivo*, the hepatic zonation, 3D cultures (Allen et al., 2005; Toh et al., 2009; Inamdar and Borenstein, 2011; Xu et al., 2012). These biochips can be fabricated with materials that are non toxic and that have flexible properties, such as Polydimethylsiloxane (PDMS) (Huh et al., 2011; Inamdar and Borenstein, 2011; Ghaemmaghami et al., 2012). Different kinds of tissue cultures have been investigated in the biochips and thus used to reproduce multi-organ interactions (Huh et al., 2011). Each compartment of these biochips can represent the function of one organ (Viravaidya and Shuler, 2004; Kimura et al., 2009; van Midwoud et al., 2010; Choucha-Snouber et al., 2013). The microfluidic network and

geometry are used to interconnect those organs and to investigate their interactions (Inamdar and Borenstein, 2011; Ghaemmaghmi et al., 2012). Moreover, the possibility of parallelizing and connecting several biochips makes it possible to increase the number of results obtained by experiment (Domansky et al., 2010; Baudoin et al., 2013).

In this paper, we propose to introduce a new microfluidic device (called IIDMP for Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) to investigate organ-to-organ interactions. Indeed, this device consists of an intestinal and a perfused liver compartment. The function of these two major organs is mimicked by the co-culture of the intestinal Caco-2 TC7 cell line as an intestinal barrier model and of the liver HepG2 C3A cell lines in microfluidic biochips.

Human colon carcinoma cell line Caco-2 cells cultivated on an insert Petri barrier model are one of the most accepted *in vitro* absorption models for simulating intestinal transport. These cells are able to form a tight differentiated monolayer with properties similar to those of the human intestine and allow the quick study of the mechanisms of the drug absorption (Hidalgo et al., 1989). Moreover, the clone Caco-2 TC7 has specific interesting properties, such as a faster growth, a lower transepithelial resistance and a better metabolism performance *via* enzymes like the CYP3A when compared to the Caco-2 cells. In addition, this clone allows a decrease in variability between experiments and laboratories (Chantret et al., 1994; Caro et al., 1995; Raeissi et al., 1997; Grès et al., 1998; Sambuy et al., 2005). These properties make the Caco-2 TC7 a valuable intestinal model for *in vitro* study of absorption, first pass metabolism and drug toxicity.

HepG2 C3A cell line is easy to use and makes possible to investigate the production of albumin, and metabolism of glucose and urea (Donato et al., 2008). Moreover, our previous studies showed the ability of these cells to enhance the CYP450-1A biotransformation process in microfluidic culture (Prot et al., 2011a). The ability of these kinds of cell to be integrated into parallelized microfluidic cultures using a platform called “Integrated Dynamic Cell Cultures in Microsystems” (IDCCM) was previously demonstrated (Baudoin et al., 2013).

Before using the co-culture device IIDMP as an effective screening platform for the study of xenobiotic pharmacokinetics or toxicity, it was necessary to

investigate the viability, functionality and metabolic activity of the two types of cell line in the device. Thus, we investigated the integrity and efflux properties of the Caco-2 TC7 cells, functionality and the CYP1A activities of the HepG2 C3A placed in the co-culture device. We compared the results obtained in Petri static co-culture conditions to dynamic co-cultures conditions. Then, we studied intestine absorption and liver metabolism using the drug phenacetin, to assess the functionality of the cell lines and demonstrate the performance of the IIDMP. Phenacetin was selected as a demonstrator compound due to its quick absorption in the intestine and its metabolism in the liver into acetaminophen (APAP) *via* the CYP1A2 isoform (Venkatakrishnan et al., 1998; Kimoto et al., 2009).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Cell lines and culture medium

The human carcinogenic epithelial cell line Caco-2 clone TC-7 was a kind gift from Dr M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France) and the hepatocarcinoma cells HepG2 C3A were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Both cell culture media contained Minimal Essential Medium (MEM, Gibco), 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid solution (100x), 1% hydroxyethylpiperazine-N 0 2-ethanesulfonic acid 1M (HEPES, 10mM), 100 units/mL penicillin-streptomycin, 1% L-Glutamine 200mM (2mM) and 1% Sodium pyruvate 100mM (2mM). All these components were obtained from Gibco.

Cells were cultured in 75cm² flasks at 37°C in a humidified air atmosphere with 5% CO₂. At 80% of confluence, the Caco-2 TC7 cells were directly seeded on to an insert transwell polycarbonate membrane (6 wells plate, 24 mm diameter with 0.4 µm pore, TC-treated; Sigma Aldrich SA, Saint Quentin Fallavier, France) at a density of 100 000 cells/cm², 21 days before the start of the experiments. The HepG2 C3A and Caco-2 TC7 media were changed every other day. To limit the variability of the experiments, the Caco-2 TC7 cells were used between passages 25 and 45 and HepG2 C3A cells between 10 and 35.

2.2 The co-culture perfusion device

The co-culture bioreactor was named an Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform (IIDMP). This co-culture bioreactor is a polycarbonate fluidic platform composed of three identical and parallelized perfusion co-culture units. The platform was manufactured to integrate three cell culture inserts (the inserts having the conventional 6-transwell plates format) with three liver microfluidic biochips (Figures 1: A and B). Each co-culture unit contained two wells used as reservoirs, one cell culture insert and one microfluidic biochip. The cell culture insert was located in the first well. Due to the insert, an apical and a basolateral compartment could be distinguished in this first well (figure 1: A). The bottom of the basolateral compartment of this first well was connected to the second well by the microfluidic biochip. To make recirculating perfusion possible, the second well and basolateral compartment

of the first well were also connected to a peristaltic pump by a specific cover hermitically closing the box (figure 1: B). This cover included ports for fluid perfusion and sampling. The tight closure was ensured by silicon joints (Figure 1: B). The manufacture and conception of the microfluidic biochips with Polydimethylsiloxane (PDMS) has been described previously. We used a similar design and manufacturing process for the biochips as that reported in (Baudoin et al., 2012). Moreover, the size of the biochips layers was fixed and then, all the biochips used during the experiments had the same thickness of 8,5 mm (3,5 mm for the lower face and 5 mm for the upper face).

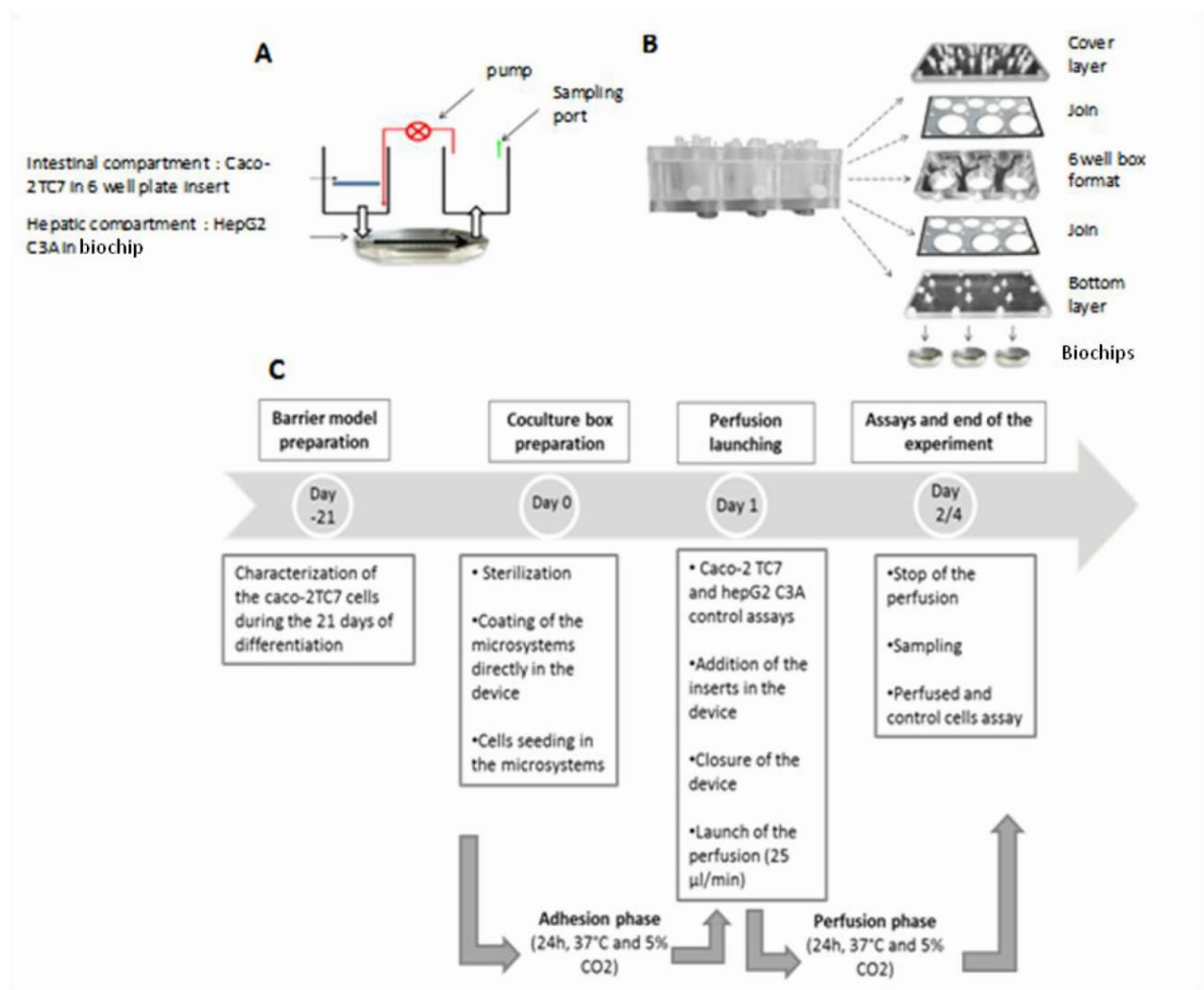


Figure 1: Principle (A), design (B) and experimental steps (C) of the intestinal and hepatic co-culture

During the experiment, the apical medium in the intestinal compartment remained in static conditions. The flow rate in the microfluidic biochip was fixed by the pump at 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ based on our previous optimization in microfluidic cultures performed with HepG2 C3a (Baudoin et al., 2012). There was 1.5mL of medium in the apical intestinal compartment and a total of 10mL in the intestine basolateral and hepatic compartments (including the 40 μL in the biochip, 7.5 mL in the basolateral first well and 2.5 mL in the second well).

2.3 Experimental procedure of the dynamic co-culture

Each experiment took place over 3 days (figure 1: C). Before inoculating the cells, a coating step with fibronectin (Roche) at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1h at 37°C was performed. Then, we seeded the HepG2 C3A in the microfluidic biochips with a density of 500 000 cells per biochip (250 000 cells/ cm^2). The seeding was directly performed by micropipetting in the biochips when they were connected to the IIDMP. During the seeding, the cell remained in 240 μL (40 μL in biochip and 100 μL volume in each connector between the biochip and the fluidic platform). After cell inoculation, the Caco-2 TC7 inserts (see section 2.1) were transferred into the first wells of the IIDMP. Then the box was closed hermetically with the cover and placed in static conditions (no flow rate perfusion) at 37°C in a humidified air atmosphere 5% CO_2 incubator. After 24h of static conditions for liver cell adhesion, the control tests at day one of the experiment (D1 control) were performed (tests detailed below). The box cover was then connected to the pump with PTFE tubes and the perfusion was launched for 24h to 48h at 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ in the incubator. At the end of the perfusion, the tests were performed in the biochips and the inserts (D2 IIDMP).

For comparative purposes, we compared the IIDMP results with Petri static controls and previously developed biochips (described below).

At the end of the experiments, the biochips, IIDMP platforms, and tubes were washed and sterilized by autoclave for the next utilization.

2.4 Static Petri Caco2-TC7 monocultures and the Caco2-TC7/HepG2 C3A co-culture controls

The static monoculture of Caco-2 TC7 in Petri with insert was similar to the one described in section 2.1.

The Caco-2 TC7/HepG2 C3A Petri co-culture was done following the protocol proposed by Choi and colleagues (Choi et al., 2004). Briefly, the Caco-2 TC7 cells were cultivated in a transwell polycarbonate membrane (6-well plate, 24 mm diameter with 0.4 μm pore, TC-treated; Sigma Aldrich SA) at a density of 100 000 cells/cm² for 21 days until full differentiation. At this time, the HepG2 C3A cells were seeded in the bottom of 6 well plates with the same density as that used in the biochips (250 000 cells/cm²) after a coating with fibronectin. After overnight adhesion, the Caco-2 TC7 cells on the inserts were placed just above the HepG2 C3A. Then, the static co-culture consisted of two chambers representing the apical and basolateral sides. The Caco-2 TC7 cells on membrane delimited the apical side and the HepG2 C3A cells were cultivated in the basolateral side. The volume of culture medium was 1.5 ml on the apical side and 2.5 ml on the basolateral side.

2.5 Static and dynamic pure liver cultures in IDCCM control biochips

The dynamic cultures of HepG2 C3A in microfluidic biochip controls were done with our previously developed bioreactors called IDCCM for Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems (Baudoin et al., 2012). Briefly, this bioreactor has the same design and principle as the co-culture bioreactor but without the intestinal barrier. Then, each IDCCM unit contained also two wells used as reservoirs and connected by each other by the biochip. The medium flow rate was fixed with the same pump used with the IIDMP device. The use of the IDCCM made possible the dynamic culture of HepG2 C3A in the same PDMS microfluidic biochips as those used with the co-culture bioreactors. The culture conditions were similar to the IIDMP conditions (fibronectin coating, 250 000 cells/cm², 25 μL /min flow rate, same culture medium). The number of biochips used during the experiments was twelve with the IDCCM device whereas only three were used with the IIDMP device. Moreover, the decrease of the wells size of each IDCCM unit is linked with a decrease of the

medium culture volume use in this device. This volume is fixed at 4 mL for each IDCCM unit whereas 10 mL was used for each IIDMP unit.

The static culture of HepG2 C3A in non-perfused biochips was also tested as a second type of control. The biochips were prepared in a similar manner including fibronectin coating, 250 000 cells/cm², and the same culture medium but the flow rate was set at 0µL/min.

2.6 Integrity and functionality of the intestinal monolayer

At full differentiation, intestinal epithelial cells should express functional tight junctions reflected by low permeability to macromolecules and a high transepithelial electric resistance.

2.6.1 Lucifer Yellow

The Lucifer Yellow (Sigma) flux was used to test the paracellular transport of Caco-2 TC7. Lucifer Yellow was measured using a final concentration of 50 µM in HBSS with 1% DMSO and with Hepes at 10mM. The Lucifer Yellow was loaded in the apical side. After 90 min of presence in the incubator, the medium was sampled from the apical and basolateral compartments. The level of Lucifer Yellow was read in a fluorescent plate reader (fluorimetre TECAN, Spectafluor plus, Magellan software), using an excitation of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

The Lucifer Yellow flux was expressed by the calculation of the apparent permeability.

$$(1) P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{AC_a}$$

In which

P_{app} is the apparent permeability in [m/s]

dQ/dt is the amount of compound transported within a given time [mol/sec]

C_a is the initial concentration in the apical solution (mol/m³)

A is the surface area of the insert filter membrane [m²]

2.6.2 Transepithelial electrical resistance

Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured in our device with the ENDOHM-24SNAP Chamber for 24mm and COSTAR Snapwell TM culture cup, (6 wells per plate).

$$(2) TEER = (R_m - R_b)A$$

In which

R_m is the resistance reading obtained for the cell monolayer [Ohm]

R_b is the resistance reading obtained for the blank insert (without cells) [Ohm]

A is the surface area of the insert filter membrane [cm²]

TEER was expressed in $\Omega \cdot \text{cm}^2$. We used a TEER threshold for Caco2-TC7 cells of 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ to begin the drug absorption tests (Turco et al., 2011).

2.6.3 Tight junction markers

The tight junctions of the Caco-2 TC7 were characterized by immunostaining. The immunostaining was done with claudin-1 and occludin markers. The primary antibody used to mark the occludin was a rabbit anti-occludin (Invitrogen) and for the claudin-1, the rabbit anti-claudin-1 (Invitrogen). The secondary antibody was an anti-rabbit IgG AlexaFluor 488 from goats (Invitrogen). This test was coupled with DAPI staining to color the nuclei of the cells.

Briefly, cells were fixed with paraformaldehyde 4 % during fifteen minutes at room temperature. After some PBS rinsing, cells membranes are permeabilized for 10 minutes with Triton X100 (BDH) diluted to 0.1% in PBS. The saturation of non-specific sites was performed with goat serum at 3 % for 10 minutes. Then, cells were incubated with the primary antibody for 1 hour at 4 °C. For occludin, the antibody solution was diluted to 1:100 in PBS and goat serum at 1 %. For claudin-1, the dilution was 1:20. After rinsing with PBS, the membranes were incubated with the secondary antibody 1 hour in the dark. For occludin and claudin-1, the dilution was respectively 1:100 and 1:50 in PBS and goat serum at 1 %. Image acquisition was performed on a conventional fluorescence microscope (Leica DMI 6000B, LAS-AF software, Leica Microsystems, Nanterre France).

2.6.4 P-glycoprotein functionality

The apparent permeability and efflux ratio of rhodamine 123 (Sigma) confirmed P-glycoprotein (Pgp) activity (Troutman and Thakker, 2003). Rhodamine 123 (15 μ M) was dispensed to the apical compartment or to the basolateral compartment of the inserts used to assess Rh123 apical to basal (A-to-B) and basal to apical (B-to-A) permeability. Rhodamine 123 fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 485/530 nm using the fluorimeter TECAN, Spectafluor plus.

The efflux ratio (ER) of the rhodamine 123 was calculated with the following formula

$$^{(3)} ER = Papp_{B\ to\ A} / Papp_{A\ to\ B}$$

In which

$Papp_{B\ to\ A}$ is the $Papp$ value measured in the basal to apical direction

$Papp_{A\ to\ B}$ is the $Papp$ value measured in the apical to basal direction

2.7 Viability and activity of the liver cells

Cells were counted using a Malassez cell after detachment with trypsin 0.25% EDTA.

Viability of the HepG2 C3A cell lines placed in the biochips was quantified by the quantitative Alamar blue test (Fischer). This test is based on resorufin formation by rezasurin reduction, a reaction in relation to the mitochondrial activity of the viable cells. Before and after the perfusion stage, 300 μ L of alamar blue (rezasurin) was added in each microchip (diluted 1:10) and the chips were incubated for 1h at 37°C in an incubator. Samples were then carefully removed and read directly in a fluorescent plate reader using a 530 nm excitation and an emission filter of 595nm (fluorimeter TECAN, Spectafluor plus, Magellan software). Resulting values were expressed in intensity of fluorescence normalized by the number of counted cells at the end of the experiment (cells were counted after trypsination). Results obtained after co-culture experiments were compared with the results after IDCCM experiments.

Calcein AM and Propidium iodide IP (Molecular Probes) were also used to perform the *in situ* visualizations of the living cells in the microchips, as previously described (Legendre et al., 2013).

Albumin synthesis was investigated by an ELISA Sandwich technique (anti Human Albumin IgG coupled with peroxylase) following our previous protocol (Baudoin et al., 2012).

2.8 Analysis of CYP1A activity

2.8.1 Ethoxyresorufin test

CYP1A1 activity was assessed by modulation of the enzymatic activity of ethoxyresorufin-o-deethylase as previously described (Baudoin et al., 2012).

2.8.2 Metabolism of the phenacetin

2.8.2.1 Experimental protocol

Phenacetin (Sigma) in culture medium at 100 μ M was added to the apical medium of the intestinal compartment. Adsorption in the IIDMP platform was checked without cells and compared with the adsorption values obtained after phenacetin exposure of classical co-culture static Petri dishes. The adsorption values were expressed as a percentage of the initial concentrations of phenacetin. Phenacetin concentrations in the intestinal and hepatic chambers were measured during 48h of dynamic and static co-culture.

The appearance of acetaminophen (APAP) was then checked in the two compartments of the IIDMP (loaded with caco-2 TC7 and HepG2 C3A cells) after 1h, 5h, 8h, 24h and 48h following phenacetin exposure. Each 100 μ L sample was then stored at -20°C for further analysis. APAP production was expressed either in nmoles/ 10^6 cells either by the ratio of the quantity of metabolized APAP over the initial quantity of phenacetin.

2.8.2.2 Mass spectrometry analysis

An Agilent QQQ 6460 mass spectrometer with a jet stream electrospray ion source and an Agilent 1200 series fast resolution LC system (Wilmington, DE) was employed to detect phenacetin and acetaminophen in the culture medium samples. MassHunter software was used for system control, data acquisition, and data processing. LC separation was performed on an Phenomenex Kinetex C18 reverse

phase column (100 mm × 2.1 mm *i.d.*, 2.6 µm particle size) maintained at 45 °C with a gradient program at a flow rate of 0.5 ml/min. The mobile phase A consisted of 100% HPLC grade water with 0.1% formic acid and mobile phase B consisted of 100% HPLC grade acetonitrile. The gradient started with 2% solvent B, held at 2% B for 2 minutes before being increased to 95% B in 6 min and was then held at 95% B for 1 additional minute. The column was re-equilibrated with 2% B for 1 min. Total run time was 9 min with a 10 µL injection volume. The mass spectrometer was operated in positive and negative jet stream ESI modes. Nitrogen was used as a nebulizer, turbo (heater) gas, curtain, and collision-activated dissociation gas. The capillary voltage was +3800 V and -3500V. The ion source gas temperatures were 350 °C with flows of 12 L/min. Jetstream gas temperatures were 400 °C with flows of 12 L/min. Phenacetin and APAP were measured by selective reaction monitoring (SRM). Supplement table 1 lists the optimal mass spectrometric settings (fragmentor and collision energy) for each quantifying and qualifying transition. The lower limit of detection was 0.1µM for phenacetin, APAP, sulfate and glucuronide APAP and 0.2µM for glutathione-APAP. The calibration curve was performed with external standard using a mixture of all compounds diluted in the culture medium used in the experiments.

2.9 Statistical analysis

At least 3 biochips by experiments were used for a total of 3 independent experiments (n=3) for each condition. The results were expressed as mean ± standard deviations (SD). Statistical analysis was performed by one way ANOVA for multiple comparisons. The Student t test was used for the comparison using GraphPad software (Prism 6). The used *p-value* are reported in the figures

3. RESULTS

3.1 IIDMP conception

The conception of the co-culture platform was based on the combination of a polycarbonate structure, PDMS microfluidic biochips and the classic transwell inserts. Microfluidic biochips were placed at the bottom of the box and were easily removable, simplifying external study by a complementary set up (staining and fluorescent microscopy analysis for instance). The plugging ports located on the box cover made it possible to sample the culture medium during the experiments. Cell seeding was directly performed in the biochips placed at the bottom of the IIDMP with a micropipette leading to control of the inoculated cells number (here 500 000 cells per biochip). Likewise, the inserts were just put into the wells and they could easily be changed or removed by means of a short unscrewing step (Figures 1: A and B).

The tight closure of the device was confirmed before use by a pressure test in water (typically at a pressure of 20 cm of water). In order to avoid leakage during experimentation, silicon joints were placed around the connector linking box and biochips. These joints were changed after five uses of the box in major experimentations. It is also important to underline that the microfluidic biochips were only used for 5 to 10 experimentations to avoid biochip damage by successive sterilization phases.

3.2 Characterization of the Caco-2 TC7 in 21 days of differentiation

Integrity of the intestinal barrier consisting of Caco-2 TC7 cultures on polycarbonate inserts was first evaluated during the 21 days of differentiation before integrating the cell insert into the IIDMP. The differentiation of tight junctions, which is indicative of cell contiguity and confluence, was checked by measuring the restrictive paracellular transport by transepithelial resistance (TEER) and with Lucifer Yellow transport.

TEER values significantly increased between day 7 and day 14, reaching a value of $245 \pm 25 \text{ Ohm.cm}^2$ until 25 days of differentiation. An opposite trend was observed with Lucifer Yellow apparent permeability. This latter was first high, then it decreased to reach an approximate value of $5 \pm 2 \text{ nm/sec}$ between days 14 and 25 (Figures 2: A and B). Moreover, the presence of the tight junctions was confirmed by

uniform staining of two major constitutive proteins of these junctions, namely claudin-1 and occludin (Figure 2: C). The Caco-2TC7 cells at confluence were well delimited by tight junctions and organized in a characteristic geometry.

The functionality of the P-glycoprotein (Pgp) which is involved in the efflux of many xenobiotics was also investigated during the differentiation phase (Figure 2: D). The ratio efflux of rhodamine 123 increased over 14 days of differentiation to reach a value of about 9 on the 21h day of differentiation. This value then tended to stabilize until 25 days of culture.

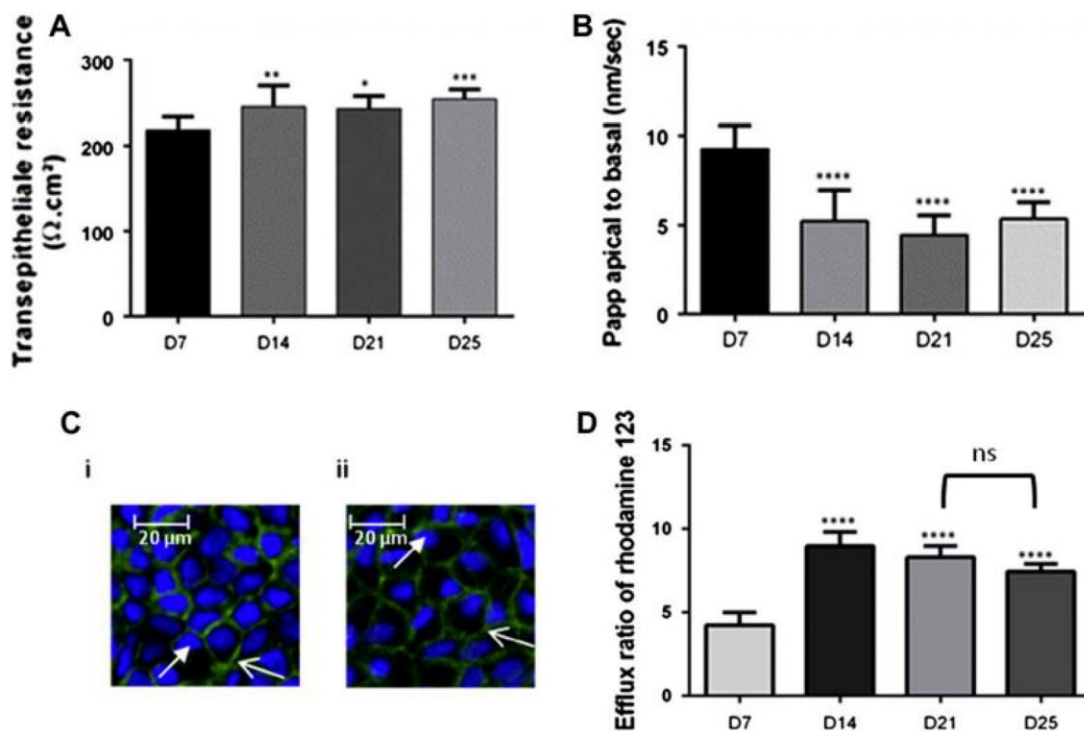


Figure 2 : Evaluation of the integrity and functionality of the intestinal barrier during twenty-five days of Caco-2 TC7 culture in Petri dishes. Transepithelial resistance (TEER) measures (A), apparent permeability (Papp) to the Lucifer yellow (B) and staining of tight junction components: occludin (C: i) and claudin-1 (C: ii). The tight junction (open arrows) components were stained in green by specific antibodies and the nuclei (closed arrows) in blue by DAPI. The Pgp activity was investigated by the measures of the efflux ratio of rhodamine 123 (D). The results obtained between seven days (D7) and twenty-five (D25) days of static differentiation are expressed relative to the control consisting of the static culture of Caco-2 TC7 during seven days (D7). Each bar represents the mean \pm SD of values. At least three independent experiments were performed. *, *** and **** indicate significant differences ($p_{\text{value}} < 0.05$, $p_{\text{value}} < 0.005$ and $p_{\text{value}} < 0.001$) compared with the control value (one-way ANOVA). ns indicates non significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$).

3.3 Effect of the dynamic co-culture on the intestinal integrity

We checked the integrity of the Caco-2TC7 cells before and after the use of the intestinal monolayer in the IIDMP. We found that TEER was superior to the threshold value ($200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ at 22 days of differentiation) before the use of the intestinal barrier in the IIDMP. Furthermore, apparent permeability was about 6 nm/s after one day of the experiment (D1 control) which corresponds to 22 days of differentiation (Figures 3: A and B).

Neither the TEER value nor Lucifer Yellow apparent permeability were significantly different after one day of dynamic co-culture or static culture when compared with the control (Figures 3: A and B). The stability of intestinal expression of the tight junctions was confirmed by staining. Those results indicated the maintenance of a suitable integrity and an appropriate differentiation of the junctions after a dynamic co-culture (Figure 3: C). The Caco2-TC7 cells at confluence were well delimited by green junctions and organized in a characteristic geometry. The nuclei were uniformly colored in blue by DAPI staining confirming optimal cell viability (no DNA fragmentation in the nucleus). No alteration was observed after the occludin or claudin-1 stainings (Figure 3: C).

No difference in the efflux in rhodamine 123 was observed before or after 24h of dynamic or static cultures (Figure 3: D).

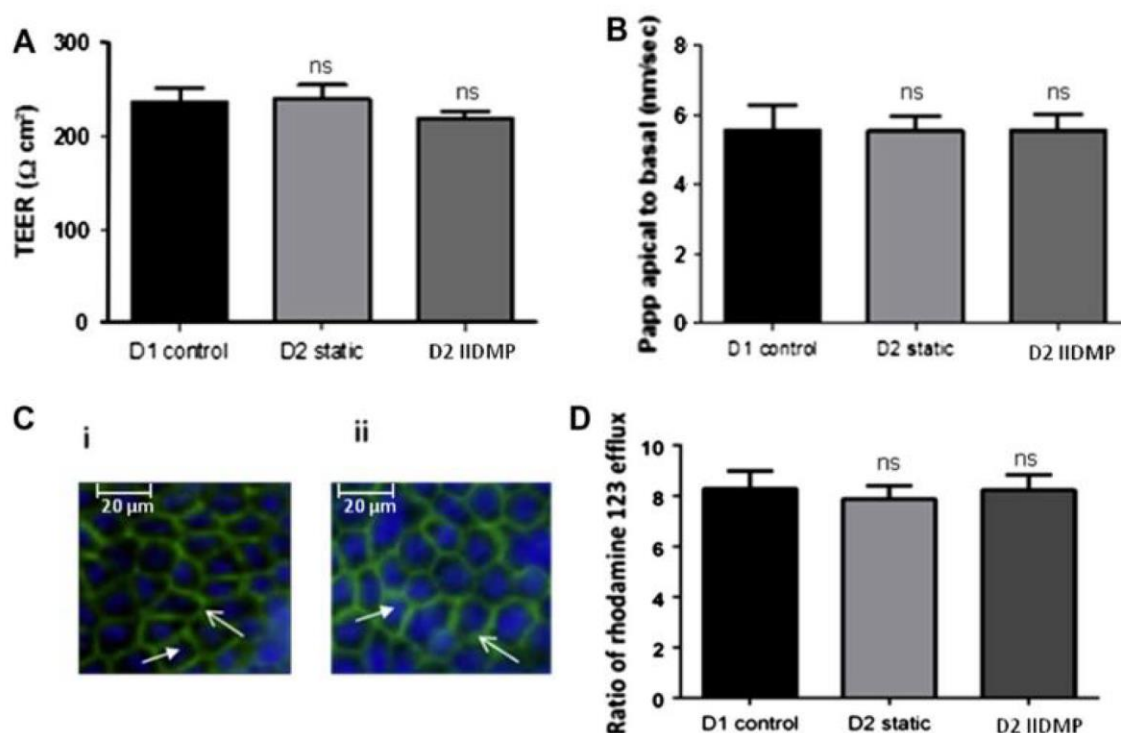


Figure 3 : Evaluation of the integrity and functionality of the intestinal barrier after 24h of dynamic co-culture. Transepithelial resistance (TEER) measures (A), apparent permeability (Papp) to the Lucifer yellow (B) and staining of tight junction components: occludin (C: i) and claudin-1 (C: ii). The tight junction (open arrows) components were stained in green by specific antibodies and the nuclei (closed arrows) in blue by DAPI. The Pgp activity was investigated by the measures of the efflux ratio of rhodamine 123 (D). The results obtained after one day of static culture in Petri (D2 static) or dynamic co-cultures (D2 IIDMP) the control consisted of the static culture of Caco-2 TC7 after 21 days (D1 control). Each bar represents the mean \pm SD of values. At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_value > 0.05$) compared to the control value (one-way ANOVA).

3.4 Integrity and functionality of the HepG2 C3A cells placed in the hepatic compartment

The day before starting the co-culture experiments, HepG2 C3A seeding was performed in the biochips. To assess the functionality of the HepG2 C3A tissue, we investigated the evolution of the morphological characteristics and viability of the HepG2 C3A cells placed in the biochips. Cell adhesion in the biochips, achieved in 24 hours under static conditions, was characterized by specific changes in cell morphology. The cells modified their spherical shape, as shown soon after seeding (Figure 4: A), and presented their classical polygonal shape after adhesion (Figure 4:

B). No density difference was observed after one day of adhesion followed by one day of static culture or dynamic co-culture in the microfluidic biochips (Figures 4: C and D). The cells exhibited similar morphological features either after adhesion (Figure 4: B) or after one day of culture (Figure 4: D).

Viability tests performed by Calcein AM and PI staining reported the presence of only a few number of dead cells after one day of both static and dynamic culture in the biochips (Figure 4: E and F). No statistical difference was counted between the IDCCM, IIDMP and control cultures (Petri and static biochips).

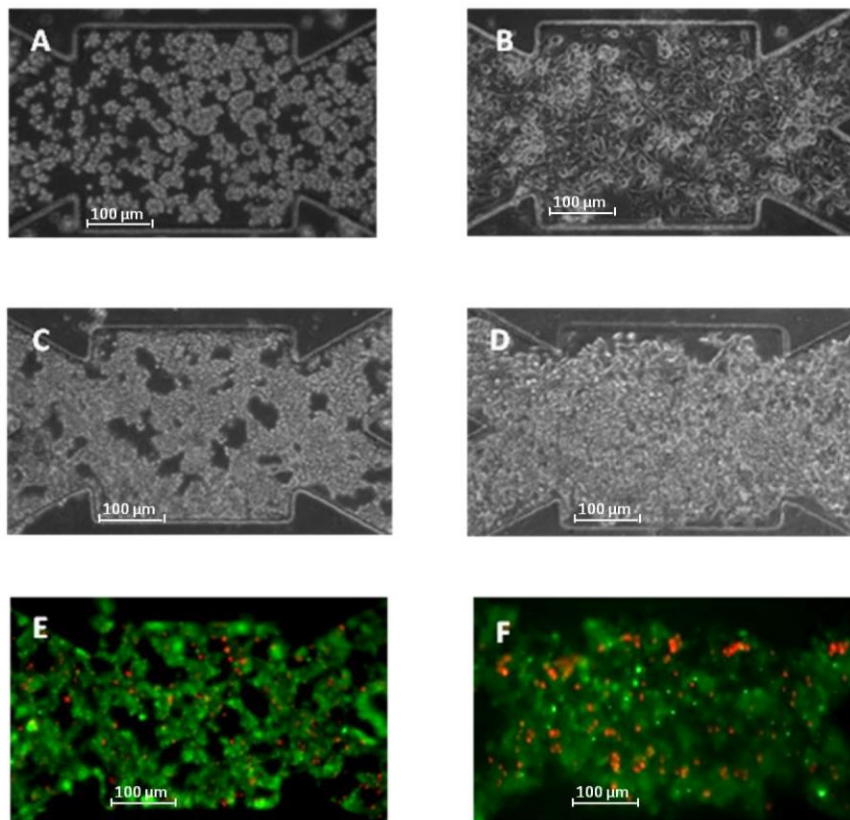


Figure 4: Microscopic analysis of HepG2 C3A integrity in the microchips. The cell morphology was investigated after seeding (A), adhesion (B) and after one day of static culture in the biochips (C) or dynamic (D) co-culture. In these two last conditions, the viable cells in green and dead cells in red were stained with a mixed of IP and Calcein AM (E and F).

These results were confirmed by measuring cell metabolic activity using the alamar blue assay after static adhesion, one day of static culture and one day of dynamic culture conditions in the biochips (Figure 5: A). Results were expressed as a viability percentage relative to the control tested after just 24h of static adhesion; no statistical difference was observed in any of the conditions.

The albumin production by the HepG2 C3A cells was evaluated in dynamic co-culture conditions and compared with dynamic HepG2 C3A cultures in the IDCCM platform (Figure 5: B). We also confirmed that the Caco-TC7 cells did not produce albumin when cultivated in inserts.

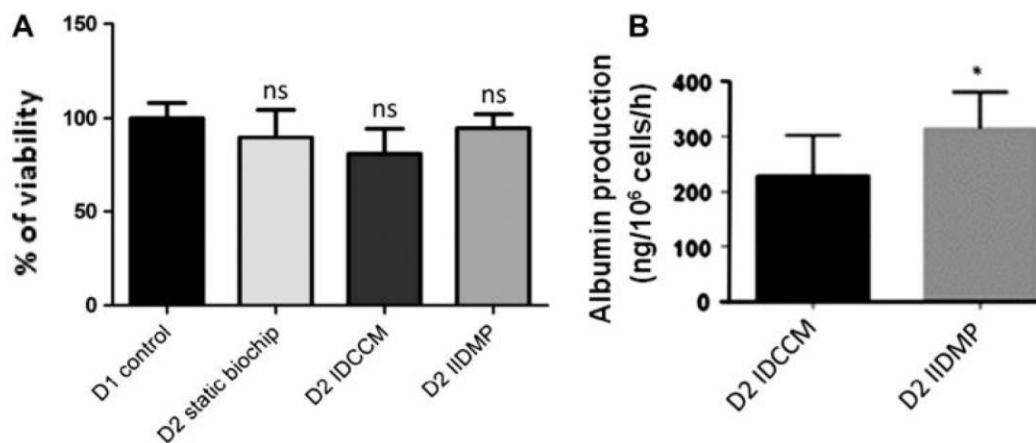


Figure 5: Evaluation of HepG2 viability and functionality by measuring alamar blue metabolism (A) and albumin production (B). The alamar blue results obtained after one day of static culture in the biochips (D2 static), dynamic co-culture (D2 co-culture) and in the IDCCM (D2 IDCCM) are expressed as a percentage of the control consisting of the static culture of HepG2 C3A after adhesion (D1 control) (one-way ANOVA). Albumin production is expressed in ng/10⁶ cells/h and the values obtained after 24h of dynamic co-culture and in the IDCCM box are compared (t-test). At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$). * indicates a significant difference ($p_{\text{value}} < 0, 05$) compared to the control value.

To evaluate the activity of the xenobiotic metabolism by cell enzymes in the IIDMP, we focused on the CYP1A enzyme activity of the HepG2 C3A cells. At first, this activity was checked at day one of the experiment using the EROD test. After one day of static adhesion in the microfluidic biochips, CYP1A1 activity was close to zero (figure 6). This activity remained unchanged after one day of static culture in the biochips by opposition to what we observed after one day of dynamic conditions.

Indeed, CYP1A1 activity considerably increased after one day of perfusion in both dynamic co-culture conditions (IIDMP) and in the IDCCM controls. Nevertheless the levels remained low when compared to freshly isolated primary human hepatocytes (Khetani and Bathia, 2008). No significant difference was observed between the IDCCM box and the co-culture configuration after one day of perfusion.

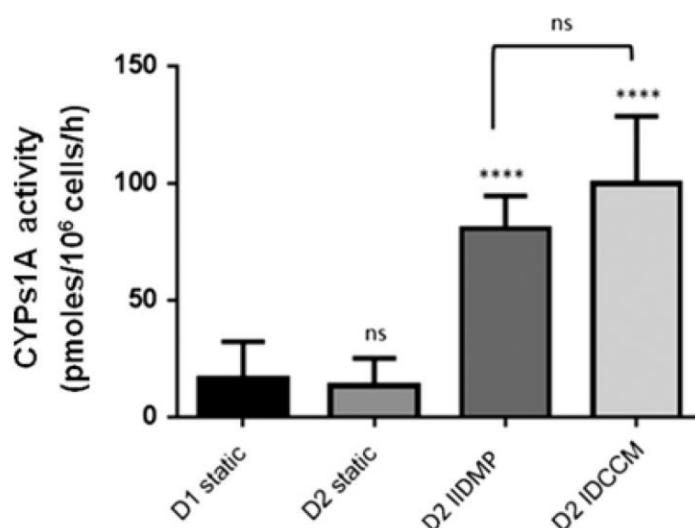


Figure 6: Evaluation of CYP1A1 activity by measuring Ethoxyresorufin metabolism. The results obtained after one day of static culture in the biochips (D2 static), dynamic co-culture (D2 dynamic co-culture) and in the IDCCM (D2 IDCCM) are expressed relative to the control consisting of the static culture of HepG2 C3A during 1 day (D1 static). At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$). **** indicates a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.001$) (one-way ANOVA).

3.5 First pass intestinal and liver metabolism of the phenacetin

Phenacetin is a therapeutic drug metabolized into paracetamol (APAP) by the CYP1A2. To illustrate the potential of the co-culture platform (in the context of a higher liver activity via the CYP1A in dynamic co-culture), phenacetin was introduced into the apical side of the co-culture Petri and of the co-culture IIDMP.

Phenacetin adsorption in the co-culture platform was at first checked without seeding cells in the co-culture bioreactor. The adsorption measured during the 48h of dynamic co-culture was compared to the values obtained in the static Petri co-culture conditions without cultivated cells inside (Figure 7). The adsorption increased during the first hours of perfusion to peak after 5h of exposure in both culture systems. The

adsorption was considerably higher in the dynamic co-culture configuration (up to 60% of the quantity of phenacetin initially introduced in the device) after 5h of exposure when compared to the Petri (20%) (Figure 7).

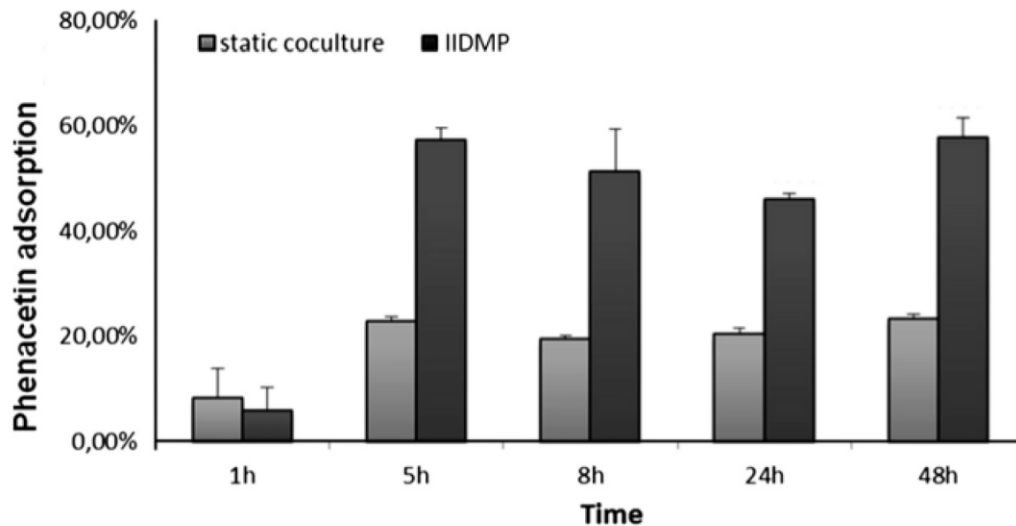


Figure 7: Evaluation of phenacetin adsorption by the static and dynamic co-cultures without cultivated HepG2 cells. The concentration of phenacetin initially introduced was 100 μ M in the apical medium. The adsorption of the phenacetin in the two systems was measured between one hour and 48h of dynamic co-culture and static co-culture without cultivated cells. Two independent experiments were performed (n=2x3 biochips).

The transport of the phenacetin through the intestinal barrier was then investigated in dynamic co-cultures and in Petri static co-cultures (Figure 8). In both conditions, the phenacetin concentration tended toward equilibrium between the intestinal and hepatic compartments from 5h to 48h of exposure.

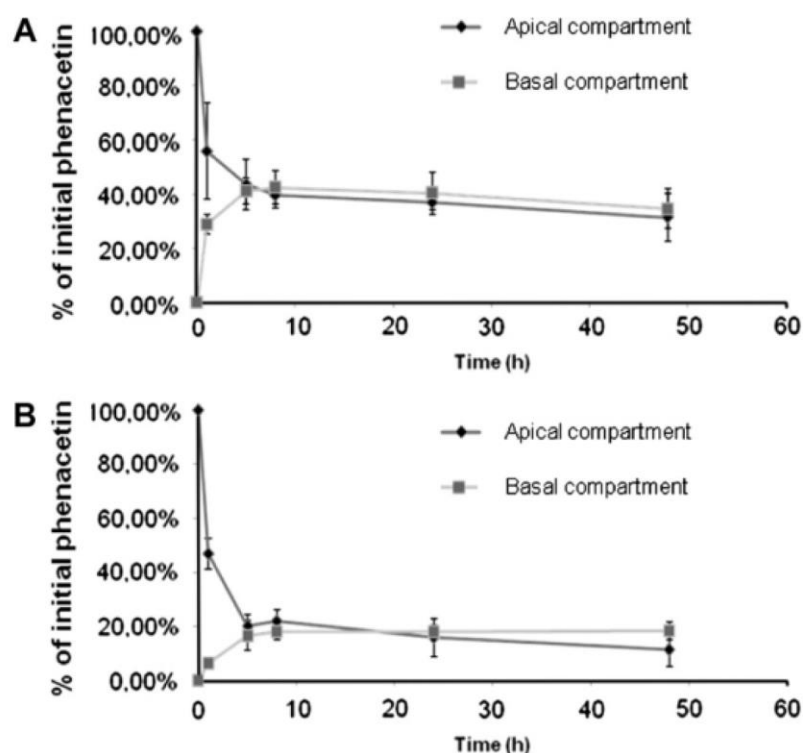


Figure 8: Evaluation of phenacetin transport through the intestinal barrier and its appearance in the hepatic compartment. The concentration of phenacetin initially introduced was 100 μ M in the intestinal compartment. The disappearance of the phenacetin from this compartment and its appearance in the hepatic compartment were measured between one hour and 48h of static Petri co-cultures (A) and dynamic co-cultures in the IIDMP (B).

The production of acetaminophen (APAP) was compared in the Petri static co-cultures, in dynamic co-cultures and in the IDCCM HepG2 C3A monoculture (Figure 9). In static co-culture conditions, the production of APAP was significantly lower than in dynamic conditions in which the production increased throughout the two days of culture. APAP production was also significantly higher in dynamic IIDMP co-cultures than in the IDCCM box from 24h to 48h of perfusion (Figure 9). We measured an APAP production after 48h of exposition of 0.7 ± 0.4 ; 8.2 ± 3.5 and 17.0 ± 4.0 nmol/ 10^6 cells in Petri, IDCCM and IIDMP respectively. For all conditions, quantity of paracetamol sulfate and of paracetamol glucuronide were below the detection limits.

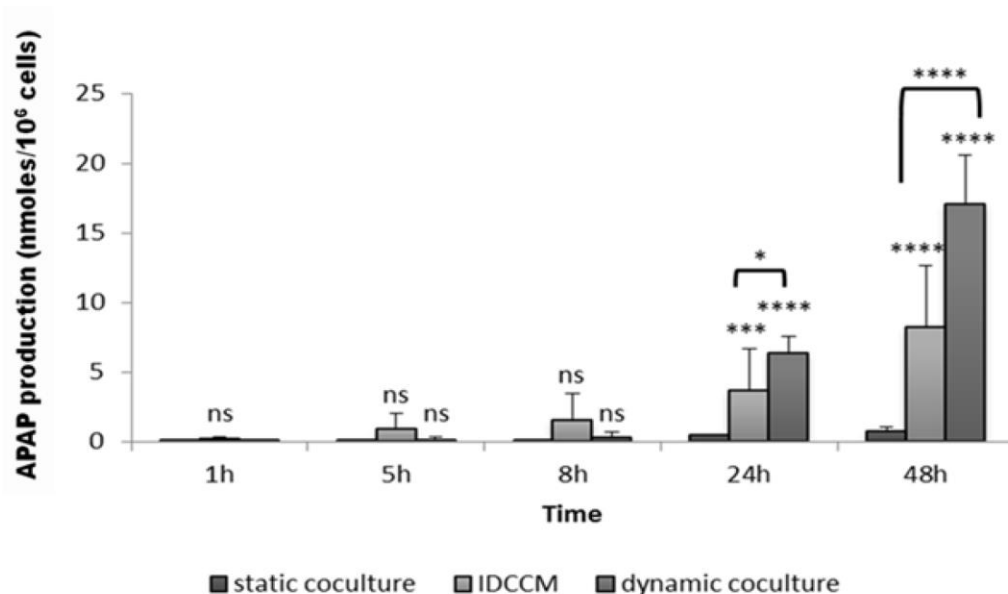


Figure 9: Evaluation of CYP1A2 activity by measuring acetaminophen production during two days of culture following phenacetin exposure. The concentration of phenacetin initially introduced was 100 μ M. Total APAP production was measured between one hour and 48h of static (Petri), dynamic co-cultures (IIDMP) and in the IDCCM box. Three independent experiments were performed. ns indicates no significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$) compared to the control value consisting of one hour of culture in the same conditions (one-way ANOVA). *, *** and **** indicate a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$, $p_{\text{value}} < 0.005$ and $p_{\text{value}} < 0.001$).

Finally, the percentage of phenacetin metabolized in APAP after 48h of exposition in the different configurations was $0.11 \pm 0.01\%$ with Caco2-TC7, $0.67 \pm 0.41\%$ in IDCCM, $1.4 \pm 0.7\%$ in Petri co-culture and $6.0 \pm 1.5\%$ in IIDMP (data not shown).

4. DISCUSSION

The new co-culture platform, IIDMP, is based on the technology and design previously developed for the IDCCM (Baudoin et al., 2012). The IIDMP, like the IDCCM, can be proposed as an *in vitro* model to cultivate HepG2 cells in a microenvironment using a continuous flow of culture medium due to the PDMS microfluidic biochips. The potentialities of the IDCCM in the metabolism and toxicity fields have been investigated in previous studies (Prot et al., 2011; Baudoin et al., 2012). The co-culture device presents the same advantages in terms of comfort and quickness of use as the IDCCM (Baudoin et al., 2012) even after the insertion of the intestinal monolayer. The design of the device allows the easy use of microsystems and of inserts for external analyses such as microscopic observation, staining and cell counting. The main difference between the two culture platforms (IIDMP and IDCCM) is the increase in the well sizes of the co-culture platforms leading to work with a larger volume of culture medium. The increase in size is at the origin of a decrease in the number of replicates to three (Figure 1: B) in the co-culture conditions *versus* twelve in the IDCCM box. This size of culture insert was selected to be able to sample the culture medium in the apical compartment for clearance and drug metabolism analysis. In addition, it played a part in generating sufficient “biological intestinal matter” for multi parametric analyses and immunostaining such as the occludin and claudin markers that were tested in this study. However, the increase in culture medium volume is related to a higher dilution of the metabolites during the metabolism study. This led to a lower sensitivity in the metabolites analysis. This problem was counterbalanced by larger sample volumes and a concentration step in mass spectrometry analysis. In addition, it made it possible to collect enough volume to test several parameters (such as albumin by ELISA, metabolism...).

The number of studies using Caco-2 TC7 cells has increased considerably these last few years. It is due to better homogeneity and the rapidity of growth of these cells as compared with that of the parental Caco-2 cell line (Sambuy et al., 2005). Before the use of this cell line in the device, we characterized the evolution in the differentiation of the intestinal barrier. The tightness of the junctions increased rapidly and was linked to a maximal value of TEER and Lucifer Yellow apparent

permeability, reached after 14 days of static culture (Figures 2: A and B). This quick evolution in intestinal integrity has been described previously (Sambuy et al., 2005) and our results obtained after 21 days on conventional Petri culture on inserts are comparable with the results obtained by other teams (Caro et al., 1995; Prieto et al., 2010; Turco et al., 2011). In the same way, Pgp activity increased until reaching a plateau between 14 and 21 days of differentiation (Figure 2: D). As previously described (Hosoya et al., 1996), the Pgp seems to be fully functional around 14 to 17 days of differentiation. However, after 21 days and until 25 days of differentiation, we observed a slight decrease in Pgp activity (Figure 2: D). We found efflux ratio values two times higher using Caco-2 TC7 at 21 days of differentiation than what has been described in the literature for the Caco-2 parental cell line (Lee et al., 2013). However, numerous culture parameter conditions, such as cell passage number, the composition of the medium used may affect the expression level of the P-glycoprotein (Sambuy et al., 2005).

No difference between Caco-2 TC7 cell viability, cell integrity and Pgp activity was observed between the Petri static and dynamic cultures. The junctions were well differentiated, the cells were at confluence and paracellular transport was not significantly different in the two culture conditions (Figure 3). These results reveal that dynamic co-culture does not cause any deleterious effects on the intestinal barrier.

The impact of the dynamic co-culture on HepG2 C3A cell lines was also evaluated. The functionality of the HepG2 C3A cells in perfused microfluidic biochips has already been investigated in previous studies in our lab (Prot et al., 2011a). Moreover, other teams used these cell lines to test their own perfused prototype (Choi et al., 2004; Mahler et al., 2009; van Midwoud et al., 2010; Ouattara et al., 2011). No significant difference was observed between 24h of static culture in the biochips or dynamic co-culture when observing the morphology and the viability of the HepG2 C3A (Figure 4). The 24h viability of the HepG2 C3A cells was the same in either the IDCCM or the dynamic co-culture system (Figures 4 and 5). However, albumin production was higher in the dynamic co-culture conditions than in the IDCCM (Figure 5: B). This difference cannot be explained by the production of the intestinal cell line because we did not observe any albumin production by the Caco-2 TC7 cells. We hypothesize a stimulating effect of the intestinal epithelium on HepG2

C3A cell functionality. Nevertheless albumin levels remained lower than levels reported with freshly isolated primary hepatocytes (Khetani and Bhatia, 2008).

The significant up-regulation of the CYP1A genes after dynamic culture of the HepG2 C3A into PDMS biochips was demonstrated in a previous study (Prot et al., 2011a). Moreover, this up-regulation was correlated with a higher activity of the CYP1A1 enzyme proved by the metabolism of EROD into résorufine (Baudoin et al., 2012). The hypothesis for the origin of this up-regulation and higher activity has been discussed previously, including modulation of the oxygenation in the hepatic cell line, cytoskeleton reorganization induced by the flow of culture medium in the dynamic conditions (Prot et al., 2011a), by a material stress from the PDMS or biochip micro environment stress (Prot et al., 2011a; Su et al., 2013). In this study, we compared the EROD metabolism of the HepG2 C3A in four different culture conditions: after a perfusion with our co-culture device, with the IDCCM box (dynamic monoculture) and after static cultures either in Petri dishes or in biochips. As already observed in dynamic HepG2 C3A monocultures (using IDCCM), the EROD metabolism increased considerably after 24h of dynamic co-culture (Figure 6). On the contrary, no activity was detected after 24h of HepG2 C3A in static biochips and in Petri cultures. In addition, the Caco-2 TC7 cells did not metabolize the EROD after 24h of either co-culture or of Petri static culture.

To test the potentiality of the co-culture platform as an application for drug metabolism studies, we carried out an apical exposure to phenacetin, a drug mainly metabolized by the CYP1A2 into acetaminophen. Phenacetin is a highly lipid-soluble drug which is absorbed *via* passive diffusion through the intestinal Caco-2 cell line (Kimoto et al., 2009). Concerning the absorption of the phenacetin through the intestinal epithelium, we observed a similar qualitative trend in static and dynamic co-cultures. From 5h to 48h following phenacetin exposure, we observed an equalization of the phenacetin concentration in the intestinal and hepatic compartments (Figure 8). The main difference observed between the two culture conditions was the quantitative global decrease of phenacetin concentration in the dynamic co-culture conditions (Figure 8). This decrease may be explained by four times more volume, a larger surface area and the silicon pipes of the peristaltic

pumps in the dynamic co-culture device when compared to the static Petri co-cultures.

One of the disadvantages of the co-culture platform is thus its adsorption feature as observed after phenacetin exposure. The adsorption phenomenon has been described in other dynamic cellular culture systems (Ouattara et al., 2011). Adsorption is probably due to the raw materials used to make the different components of the bioreactors, the biochips and the pipes. In fact, it is already known that the polydimethylsiloxane (PDMS), which is used to make the microfluidic biochips, has hydrophobic properties. It therefore tends to adsorb hydrophobic drugs, such as phenacetin, and metabolites (van Midwoud et al., 2010; Inamdar and Borenstein, 2011). Furthermore, the polycarbonate used for the box can contribute to the global adsorption (van Midwoud et al., 2012). As a result, these materials may be partly responsible for a higher adsorption of phenacetin produced in the dynamic co-culture platform when compared to the static co-culture Petri (Figure 7). Nevertheless, the use of this kind of material has many advantages, including its low cost, biocompatibility, transparency and gas permeability, as discussed and described in the literature (Huh et al., 2011; Inamdar and Borenstein, 2011). Moreover, the adsorption and desorption rates of the substrates and metabolites may be evaluated thanks to mathematical approach and additional experiments (Prot et al., 2011b; Baudoin et al., 2013). Then, this value can be used to calculate the drug clearance during pharmacokinetic drug analysis. The adsorption is also directly linked with the chemical properties of the molecules used and tends to decrease with hydrophilic molecules. However, the adsorption is actually one of the main drawbacks of the IDCCM and IIDMP devices. Consequently, further studies need to be performed to find other materials with less adsorptive properties than PDMS and polycarbonate.

APAP production was close to zero when static Caco-2 TC7 cells were exposed and remained very low in static Petri co-culture conditions. On the contrary, higher production of APAP was found after 24h of dynamic culture, either in the IDCCM box or in the co-culture device (Figure 9). We confirmed once more that perfusion and microenvironment culture conditions influence the CYP1A activity of the HepG2 C3A. APAP production was significantly higher in the dynamic co-culture

than in the IDCCM box after 24h and 48h of exposition. Percentages of metabolized phenacetin led to suppose that the administration of the drug in the Caco2-TC7 compartment either in static or dynamic co-cultures contributed to an increase of the liver metabolism performance (1.4% and 6% respectively) when compared with the results obtained in monoculture configurations (IDCCM). In IDCCM, the method of the drug exposure appeared to reduce the rate of biotransformation (to 0.7%). Several hypotheses can be proposed to explain this result and need to be investigated. Among them, it may come from a synergic effect of both the liver and intestine tissues, or an interaction of the cell co-cultures with the microfluidic culture micro-environment (Su et al., 2013). A similar synergic effect due to a dynamic co-culture of Caco-2 and HepG2 cells was previously reported for Benzo[a]pyrene metabolisms (Sakai et al., 2003). Nevertheless, these results will require future investigations to evaluate the mechanisms of the hepatic clearance involved in the different devices. Indeed, we may face to a saturable metabolism in the IDCCM due to high drug quantity whereas we may face a continuous diluted low dose exposure (due to absorption in the intestinal compartment and the liver circuit penetration) in the IIDMP.

Finally, we believe that the use of this platform can reproduce biological features of the *in vivo* situation such as the absorption of molecules through the intestine and their metabolism in the liver. In this study, the two cell lines were chosen to test the biological innocuousness of the IIDMP. These kinds of cell are robust and have a stable phenotype by comparison to primary cells. Thus, this choice was relevant to run a first study to evaluate the potential and functionality of the IIDMP. However HepG2 C3A weakly expressed numerous important CYP, such as CYP3A, involved in xenobiotics metabolism. Furthermore we did not yet demonstrate a complete metabolism sequence as far as phase II metabolisms (sulfate and glucuronide conjugates) were not detected. Future studies with more efficient hepatocytes, such as primary isolated cells, will be required to complete the evaluation of the device for *in vitro* drug screening and predictive toxicology applications.

5. CONCLUSION

In this study, we proposed a new co-culture bioreactor based on the integration of cell culture inserts and microfluidic biochips in a fluidic platform. The possibilities for such a system were demonstrated using an intestine-liver interaction model. Epithelial intestinal functionality, analyzed *via* TEER measurements, Pgp efflux and Lucifer Yellow transport investigations and tight junction immunostainings, was maintained in the bioreactor when compared to Petri controls. In the same way, the HepG2 C3A cells were not damaged by the use of microfluidic biochips in the IIDMP when compared with our previously device IDCCM. Moreover, due to the microfluidic biochips, the liver functionality of CYP1A1/2 was increased when compared to Petri controls as shown by ethoxyresorufin biotransformation into resorufin and phenacetin into paracetamol. The first pass metabolism of phenacetin by intestine and liver was used to illustrate the application of organ to organ interaction model. Biochips and Petri co-cultures resulted in paracetamol production. After the transport of phenacetin through the intestinal epithelium, the highest paracetamol production and the highest rate of phenacetin biotransformation were observed in the case of the co-culture using the microfluidic liver biochips. We found that 6% of the phenacetin was metabolized when compared to 1.4% in Petri co-cultures and 0.7% in IDCCM. Thus, in co-culture configurations, the platform played a part in enhancing the quality of the drug metabolism analysis in comparison to the Petri co-culture and biochip monoculture controls.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the “Fondation pour la recherche et l’innovation” of the University of Technology in Compiègne. We thank Vittoria Pandolfi for her help and discussion.

REFERENCES

- Allen, J.W., Khetani, S.R., Bhatia, S.N., 2005. In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor. *Toxicol. Sci.* 84, 110–119.
- Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Legallais, C., Leclerc, E., 2012. Parallelized microfluidic biochips in multi well plate applied to liver tissue engineering. *Sensors and Actuators B: Chemical* 173, 919–926.
- Baudoin, R., Prot, J.M., Nicolas, G., Brocheton, J., Brochot, C., Legallais, C., Benech, H., Leclerc, E., 2013. Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips. *Xenobiotica* 43, 140–152.
- Bhogal, N., Grindon, C., Combes, R., Balls, M., 2005. Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. *Trends Biotechnol.* 23, 299–307.
- Blaauboer, B.J., 2003. The integration of data on physico-chemical properties, in vitro-derived toxicity data and physiologically based kinetic and dynamic as modelling a tool in hazard and risk assessment. A commentary. *Toxicol. Lett.* 138, 161–171.
- Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., Zweibaum, A., Fabre, G., 1995. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 116, 147–158.
- Chang, T.T., Hughes-Fulford, M., 2009. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A* 15, 559–567.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., Rousset, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J. Cell. Sci.* 107 (Pt 1), 213–225.
- Choi, S., Nishikawa, M., Sakoda, A., Sakai, Y., 2004. Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro* 18, 393–402.
- Choucha-Snouber, L., Aninat, C., Grsicom, L., Madalinski, G., Brochot, C., Poleni, P.E., Razan, F., Guillouzo, C.G., Legallais, C., Corlu, A., Leclerc, E., 2013. Investigation of ifosfamide nephrotoxicity induced in a liver-kidney co-culture biochip. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 597–608.
- Domansky, K., Inman, W., Serdy, J., Dash, A., Lim, M.H.M., Griffith, L.G., 2010. Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering. *Lab Chip* 10, 51–58.
- Donato, M.T., Lahoz, A., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., 2008. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr. Drug Metab.* 9, 1–11.
- Ghaemmaghami, A.M., Hancock, M.J., Harrington, H., Kaji, H., Khademhosseini, A., 2012. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discov. Today* 17, 173–181.
- Grès, M.C., Julian, B., Bourrié, M., Meunier, V., Roques, C., Berger, M., Boulenc, X., Berger, Y., Fabre, G., 1998. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm. Res.* 15, 726–733.

- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749.
- Hosoya, K.I., Kim, K.J., Lee, V.H., 1996. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 13, 885–890.
- Huh, D., Hamilton, G.A., Ingber, D.E., 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 21, 745–754.
- Inamdar, N.K., Borenstein, J.T., 2011. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 681–689.
- Khetani, S.R., Bhatia, S.N., 2008. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 26, 120–126.
- Kim, K., Ohashi, K., Utoh, R., Kano, K., Okano, T., 2012. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials* 33, 1406–1413.
- Kimoto, T., Takanashi, M., Mukai, H., Ogawara, K., Kimura, T., Higaki, K., 2009. Effect of adrenergic stimulation on drug absorption via passive diffusion in Caco-2 cells. *Int J Pharm* 368, 31–36.
- Kimura, H., Nakayama, H., Yamamoto, T., Sakai, Y., Fujii, T., 2009. Development of On-chip Coculture System for Cytotoxicity Test Using Caco-2 and Hep G2. *IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines* 129, 252–258.
- Lau, Y.Y., Chen, Y.-H., Liu, T.-T., Li, C., Cui, X., White, R.E., Cheng, K.-C., 2004. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metab. Dispos.* 32, 937–942.
- Lee, S.D., Osei-Twum, J.-A., Wasan, K.M., 2013. Dose-dependent targeted suppression of P-glycoprotein expression and function in Caco-2 cells. *Mol. Pharm.* 10, 2323–2330.
- Legendre, A., Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Naudot, M., Bricks, T., Brocheton, J., Jacques, S., Cotton, J., Leclerc, E., 2013. Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. *J Pharm Sci* 102, 3264–3276.
- Mahler, G.J., Esch, M.B., Glahn, R.P., Shuler, M.L., 2009. Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 193–205.
- Ouattara, D.A., Choi, S.-H., Sakai, Y., Péry, A.R.R., Brochot, C., 2011. Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. *Toxicol. Lett.* 205, 310–319.
- Prieto, P., Hoffmann, S., Tirelli, V., Tancredi, F., González, I., Bermejo, M., De Angelis, I., 2010. An exploratory study of two Caco-2 cell models for oral absorption: a report on their within-laboratory and between-laboratory variability, and their predictive capacity. *Altern Lab Anim* 38, 367–386.
- Prot, J.M., Aninat, C., Griscom, L., Razan, F., Brochot, C., Guillouzo, C.G., Legallais, C., Corlu, A., Leclerc, E., 2011. Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1704–1715.
- Raeissi, S.D., Guo, Z., Dobson, G.L., Artursson, P., Hidalgo, I.J., 1997. Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine. *Pharm. Res.* 14, 1019–1025.
- Sakai, Y., Fukuda, O., Choi, S.-H., Sakoda, A., 2003. Development of a biohybrid simulator for absorption and biotransformation processes in humans based on in vitro models of small intestine and liver tissues. *J Artif Organs* 6, 273–281.

- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.
- Shuler, M.L., Ghanem, A., Quick, D., Wong, M.C., Miller, P., 1996. A self-regulating cell culture analog device to mimic animal and human toxicological responses. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 45–60.
- Su, X., Theberge, A.B., January, C.T., Beebe, D.J., 2013. Effect of microculture on cell metabolism and biochemistry: do cells get stressed in microchannels? *Anal. Chem.* 85, 1562–1570.
- Sweeney, L.M., Shuler, M.L., Babish, J.G., Ghanem, A., 1995. A cell culture analogue of rodent physiology: Application to naphthalene toxicology. *Toxicol In Vitro* 9, 307–316.
- Toh, Y.-C., Lim, T.C., Tai, D., Xiao, G., van Noort, D., Yu, H., 2009. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. *Lab Chip* 9, 2026–2035.
- Troutman, M.D., Thakker, D.R., 2003. Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 20, 1192–1199.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Di Consiglio, E., Testai, E., Stammati, A., 2011. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro* 25, 13–20.
- van Midwoud, P.M., Janse, A., Merema, M.T., Groothuis, G.M.M., Verpoorte, E., 2012. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal. Chem.* 84, 3938–3944.
- van Midwoud, P.M., Merema, M.T., Verpoorte, E., Groothuis, G.M.M., 2010. A microfluidic approach for in vitro assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices. *Lab Chip* 10, 2778–2786.
- Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., 1998. Human cytochromes P450 mediating phenacetin O-deethylation in vitro: validation of the high affinity component as an index of CYP1A2 activity. *J Pharm Sci* 87, 1502–1507.
- Viravaidya, K., Shuler, M.L., 2004. Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analog device for toxicity studies. *Biotechnol. Prog.* 20, 590–597.
- Xu, Y., Jang, K., Yamashita, T., Tanaka, Y., Mawatari, K., Kitamori, T., 2012. Microchip-based cellular biochemical systems for practical applications and fundamental research: from microfluidics to nanofluidics. *Anal Bioanal Chem* 402, 99–107.

CHAPITRE 5 : COMPARAISON DU METABOLISME HEPATIQUE D'HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS CULTIVES DANS DES MICROSYSTEMES ET DANS DES BOÎTES DE PETRI

Nous avons montré dans un premier article l'innocuité du dispositif IIDMP après utilisation de cellules intestinales et hépatiques de lignée (Caco-2 TC7 et HepG2 C3A). De manière intéressante, cette étude a permis de mettre en évidence qu'un flux de culture de 25µl/min associé à la culture de cellules hépatiques en microsystemes et une coculture intestin/foie constituaient deux phénomènes entraînant chacun une suractivation du CYP1A2 (par le suivi du métabolisme de la phénacétine en paracétamol) des HepG2 et une production accrue d'albumine [13] par ces cellules.

L'utilisation des HepG2 C3A était pertinente dans le cadre d'une première étude de faisabilité de ce dispositif. Toutefois, ces cellules présentent une faible activité de leurs enzymes du métabolisme des xénobiotiques et leurs propriétés sont parfois éloignées de celles des hépatocytes *in vivo*. Il était donc intéressant de remplacer les HepG2 C3A par des hépatocytes primaires humains aux propriétés bien plus similaires à celles des hépatocytes *in vivo* et donc considérés comme le « gold standard » de la culture hépatique *in vitro* [213]. Les Caco-2 TC7 ont toutefois été conservées du fait de leurs propriétés particulières et décrites dans l'article précédent [13]. De plus, la culture primaire de cellules intestinales se révèle être à l'heure actuelle un défi du fait de la difficulté de cultiver ces cellules sous forme de barrière polarisée [214,215].

Afin de différencier l'effet de la culture dynamique de l'effet des interactions intestin/foie sur la fonctionnalité des cellules intestinales et hépatiques, nous avons choisi, par souci de clarté, d'étudier chacun de ces paramètres à la lumière de deux publications différentes.

La première a pour objectif d'étudier l'impact d'une culture dynamique au sein de microsystemes sur les fonctions d'hépatocytes primaires humains. Ces microsystemes ont

été parallélisés et perfusés par l'intermédiaire d'un dispositif appelé IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) et dont le fonctionnement a été décrit dans de précédentes publications [12,13,19]. Ces études ont permis de mettre en évidence une conservation, voire une augmentation de l'activité d'EMX d'hépatocytes primaires humains cultivés et perfusés au sein des microsystèmes comparativement à la culture statique en monocouches de ces cellules pendant 4h de culture [182]. En particulier, cette augmentation d'activité a été observée pour le CYP3A4 par le suivi du métabolisme de l'oméprazole en oméprazole sulfone et du dextrométhorphan en 3-méthoxymorphinane. Le métabolite ratio lié à la production d'oméprazole sulfone était ainsi plus élevé après 4h de culture dynamique des hépatocytes primaires humains dans des microsystèmes qu'après 4h de culture statique de ces cellules dans des boîtes de Pétri [182]. De plus, la culture dynamique d'hépatocytes primaires humains dans des microsystèmes pendant 24h a été associée à une meilleure activité du CYP1A2 et du CYP3A4 (en termes de quantité d'ARNm produit) que celle observée lorsque ces hépatocytes étaient cultivés de manière statique en microsystèmes [181]. Toutefois, ces résultats étaient plus contrastés lorsque les clairances intrinsèques des hépatocytes primaires humains cultivés en microsystèmes ont été comparées à celles d'hépatocytes en suspension [181]. D'autres études avaient démontré que les conditions dynamiques de culture en microsystèmes ont un effet particulier sur l'expression et l'activité du CYP1A2 des HepG2 C3A [11,13] et sur celles d'hépatocytes primaires de rat [12,21]. Pour ces raisons, l'effet de la culture dynamique sur les hépatocytes a été étudié par le suivi de l'activité du CYP1A2 mais aussi de celles du CYP2C19 et du CYP3A4, deux EMX de phase I impliquées dans le métabolisme de la majorité des xénobiotiques ingérés. Pour cela, deux substrats de ces CYPs ont été utilisés : la phénacétine et l'oméprazole.

Afin de prendre en compte les différences de volume, d'adsorption et de méthodes d'exposition propres à l'utilisation de l'IDCCM et de boîtes de Pétri, les activités métaboliques des cellules ont été comparées en calculant les clairances hépatiques par l'intermédiaire d'un modèle PK. L'utilisation de ce modèle a eu aussi pour but de montrer la pertinence et la faisabilité du couplage de modèles *in vitro* à l'utilisation de modèles *in silico*.

Ce deuxième article a donc eu pour objectif de décrire l'effet de conditions dynamiques de culture en microsystèmes sur la fonctionnalité d'hépatocytes primaires humains, et de comparer nos résultats à ceux obtenus précédemment après culture dynamique d'hépatocytes primaires et de HepG2 C3A [11,13,21,181,182].

COMPARISON OF OMEPRAZOLE AND PHENACETIN HEPATIC CLEARANCES USING HUMAN PRIMARY CRYOPRESERVED HEPATOCYTES IN PETRI AND MICROFLUIDIC CULTURES

Thibault Bricks¹, Jérémy Hamon¹, Marie José Fleury¹, Rachid Jellali¹, Franck Merlier², Yves Edouard Herpe³, Jérôme Cotton⁴, Alexandre Seyer⁴, Jean-Marc Regimbeau⁵, Frédéric Bois^{6,7}, Eric Leclerc^{1*}

¹ CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Université de Technologie de Compiègne, France

² CNRS FRE 3580, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, Université de Technologies de Compiègne, France

³ Biobanque de Picardie, CHU AMIENS - Avenue René Laënnec, 80480 SALOUEL – France

⁴ Profilomic, 31 rue d'Aguesseau, 92100, Boulogne-Billancourt, France

⁵ Département de Chirurgie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire et Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁶ Chair of Mathematical Modeling for Systems Toxicology, Université de Technologie de Compiègne, Centre de Recherche de Royallieu, 60205 Compiègne Cedex

⁷ INERIS/DRC/VIVA/METO, Verneuil en Halatte, France.

*Correspondence should be addressed to

Eric Leclerc

CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Université de Technologie de Compiègne, France

Email: eric.leclerc@utc.fr

ABSTRACT

Cryopreserved human hepatocytes were used to compare the hepatic metabolism of phenacetin and omeprazole in Petri and in microfluidic conditions after 24h of exposure. The metabolisms of drugs were demonstrated by the productions of paracetamol, 5-hydroxy omeprazole and omeprazole sulfone. The quantification of the adsorption demonstrated higher adsorption in the microfluidic conditions for the parent drugs, whereas the metabolites of the two drugs remained weakly adsorbed in both cultures configurations. To calculate the intrinsic *in vitro* clearances, a pharmacokinetic model was used. The prediction to *in vivo* hepatic clearance was estimated using a liver well stirred model. The experimental and mathematical results showed that the metabolic performance of the hepatocytes in Petri and microfluidic cultures were similar for the omeprazole and slightly lower after microfluidic culture for the phenacetin. This led to predict phenacetin and omeprazole hepatic clearances ranging between 2.68 ± 0.39 and 0.57 ± 0.13 and between 1.07 ± 0.30 and 1.44 ± 0.32 mL/min/kg of bodyweight respectively for both culture modes (Petri and microfluidic cultures) using the well stirred model. These Petri and biochips predictions underestimated literature *in vivo* measured values (equal to 10-20 and 7.5 mL/min/kg of bodyweight for the phenacetin and omeprazole respectively). In addition, the literature predictions of hepatic clearances resulting from hepatocyte suspension cultures appeared more accurate. Our data suggest that there is probably no competitive advantage to evaluate the clearances of these drugs by using only monoculture of primary cryopreserved hepatocytes in our IDCCM microfluidic cultures on short term period.

Keywords: human primary hepatocytes, microfluidic, IDCCM, clearances, phenacetin, omeprazole

1. INTRODUCTION

The development of *in vitro* models to investigate the toxicity and the kinetic of compounds is a strategic issue for both ethical and economic reasons. Indeed, these last years, animal testing is more and more limited by the adoption of legislation concerning industry such as cosmetics industry (animals tests prohibited by the European directive 7/768/CEE) and the increase of the consideration of animal suffering (for instance the European directive 2010/63). However, the need for toxicological testing has steadily increased in many industrial sectors. The agrochemical industry is directly concerned with the European REACH regulation (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) requiring industrial testing the toxicity of more than 30 000 chemicals substances until 2018. In the same time, the needs of the pharmaceutical industry for predictive methods allowing to better target molecules able to begin the phases of drug development continues to increase. Indeed, limiting the number of candidates used at early stage of the drug development would reduce costs and the expensive late failures (Polli, 2008).

To address these problems, many alternatives including the development of new *in vitro* methods have emerged in recent years. The goal of these methods is the prediction of the mechanisms leading to the metabolism and toxicity of chemical and pharmaceutical substances (xenobiotics more generally) in a more reliable way than with the traditional culture of cells. Although, the classical cell culture was initially done in Petri dishes, the trend is the development of new *in vitro* models to restore and/or maintain metabolism functions of cultured cells at a level similar to that found *in vivo*.

In particular, the culture in microsystems offers many opportunities as the use of small volumes of culture medium and the control of the cells microenvironment (Ebrahimkhani et al., 2014; Ghaemmaghami et al., 2012). Culture in microsystems offers also the possibility to continuously renew the culture medium and eliminate waste products from the cells. Another advantage is to induce/maintain a long term and optimal cell differentiation by a mechanical stimulus (Kim and Ingber, 2013;

Nahmias et al., 2007; Tilles et al., 2001) and the establishment of concentration gradients in CO₂/O₂ and/or growth factors (Allen and Bhatia, 2005; Weibel and Whitesides, 2006). The microenvironment appeared to partially improve and to control the differentiation of hepatic cells (Ghaemmaghami et al., 2012). The fluid flow and the gradients in the microsystems may also induce phenomena of zonation (Allen and Bhatia, 2005; Nahmias et al., 2007; Tilles et al., 2001) as well as the reorganization of cells closer to the organs *in vivo* configurations (Huh et al., 2011). Finally, the culture of cells in microsystems can afford to grow different cell types together and thus recreate the complexity of the *in vivo* situation up to the interactions between tissue simulating organs (Bricks et al., 2014; Choi et al., 2004; van Midwoud et al., 2010).

In this frame, the IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems) is one of those new *in vitro* tools which allow the culture of hepatocytes in microsystems in a flux of culture medium constantly renewed. Each of these microsystems consists of a succession of microchambers and microchannels in which the cells can adhere and grow. It was previously shown that the microfluidic culture in IDCCM was associated with retention on a more long-term functionality of primary rat hepatocytes (Legendre et al., 2013) and improving hepatic metabolic characteristics of cell line compared to those of hepatocytes conventionally cultured into Petri dishes (Bricks et al., 2014; J. M. Prot et al., 2011). These advantages make of the IDCCM an *in vitro* model particularly suitable for the study of metabolic events leading to the potential toxicity of xenobiotics when using cell lines and primary hepatocytes.

However, the use of IDCCM and microsystems is still controversy when using human primary cells. Although human primary hepatocytes are successfully cultivated in microfluidic devices, the benefit of the hepatocytes cultures in the IDCCM device on their functionality did not appear yet confirm (Baudoin et al., 2013b). The purpose of this article is to study the enzyme activity of xenobiotic metabolism phase I (CYP1A, CYP2C and CYP3A) of primary human hepatocytes cultured in plated and microfluidic conditions. To compare the performance of the cells when cultivated in the IDCCM tools and in Petri, a mathematical model was used to calculate the *in vitro* intrinsic clearances and *in vivo* hepatic clearances.

Predicted clearances were then compared to the *in vivo* available data. Through this experimental and mathematical investigation, the usefulness of the IDCCM for culturing primary human cells and its advantages and disadvantages were then discussed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Primary human hepatocytes culture and medium

Primary human hepatocytes stored in cryovials were purchased from Picardie biobank (Amiens, France) and Biopredic (Rennes, France). The culture medium was purchased from Lonza (HBM Medium TM, Lonza CC- 3199) and supplemented with ascorbic acid, albumin, bovine serum and free fatty acids (BSA-FAF), factor human epidermal growth (hEGF), transferrin, insulin and Gentamicin / Amphotericin (HCM TM KitTM SingleQuots, CC-4182). At the beginning of the experiments, the human primary hepatocytes, were thawed and seeded according to the protocol established by Lonza (h NHEPS-Cells TM Instructions for Use). The contents of the cryovials from two different donors were mixed at each experiment. The seeding density in the Petri dishes (12 wells plate) and microsystems was set at 125 000 cells/cm². The seeding medium was supplemented with 2% of fetal calf serum. After the step of cell adhesion (24h at rest), the seeding medium was replaced by the culture medium without serum.

2.2 Dynamic cultures of hepatocytes in IDCCM

The dynamic cultures of primary hepatocytes in microfluidic biochips were done with our developed bioreactors called IDCCM for Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems (Baudoin et al., 2012; Bricks et al., 2014; Legendre et al., 2013). The use of the IDCCM made possible the dynamic culture of hepatocytes in PDMS microfluidic biochips whose manufacture and use have been described previously (J. M. Prot et al., 2011; Prot et al., 2012). Briefly, this bioreactor is divided into 12 units. Each IDCCM unit contains two wells (volume of 2 ml each) used as reservoirs (one entrance and one outlet) and connected by the microsystem where the hepatocytes are loaded (Figure 1: A). Then, 12 microsystems can be used simultaneously with one IDCCM platform. The perfusion is allowed by PTFE tubes connected to the cover of the IDCCM device and able to deliver the medium from the outlet to the entrance wells (Figure 1: A). The medium flow rate is fixed with a peristaltic pump at 25µl/min. The IDCCM device allows sampling the medium by specific ports placed on the cover.

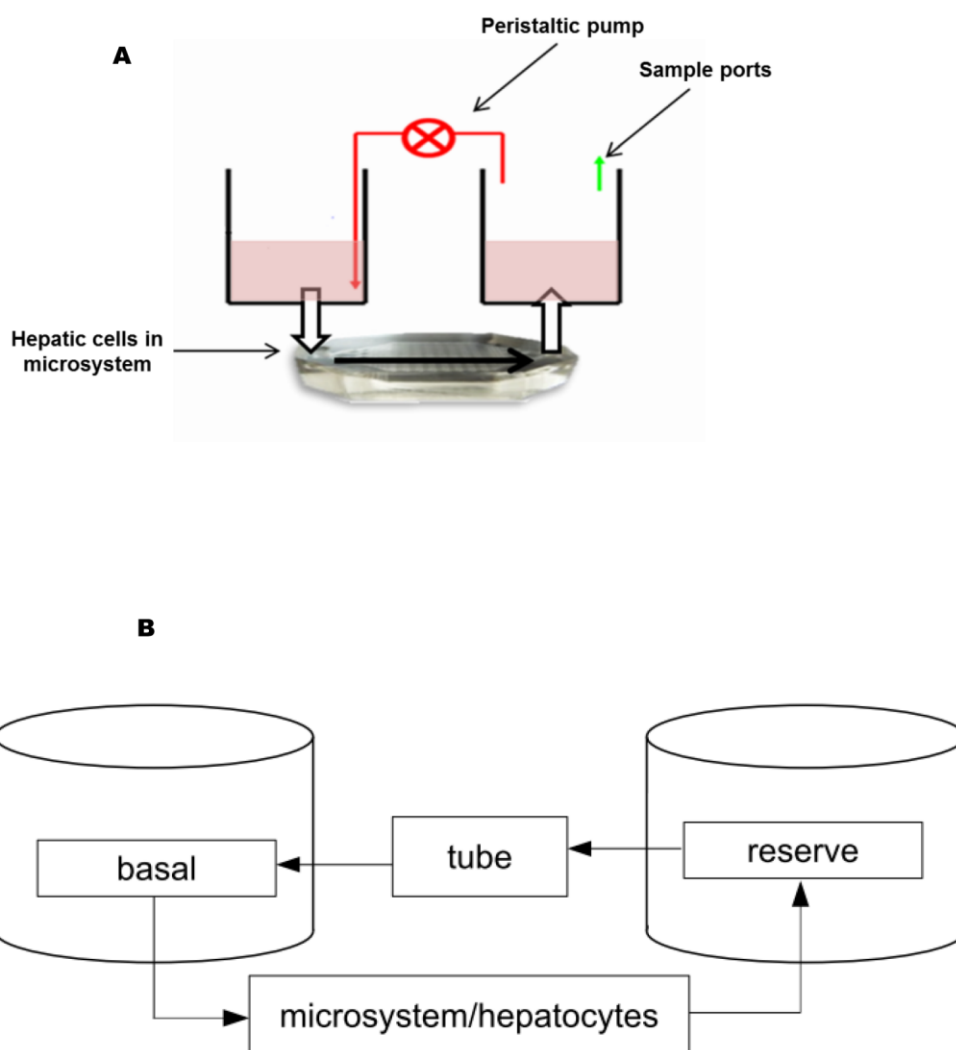


Figure 1: Unit design of the IDDCM device (A) and of the PK *in vitro* model corresponding (B).

2.3 Process of the experiment

At the beginning of the experiment, the microsystems and Petri dishes were prepared with rat tail type I collagen (Pharmingen BD Biosciences) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at 0.3 mg/mL. After 1h of incubation at 37 ° C and in an atmosphere supplied with 5% CO₂, cells were seeded at a density of 125 000 cells/cm². Once the cell inoculation was performed, the cells were incubated overnight (37 ° C, 5% CO₂) in seeding medium (described above). Following this adhesion step, the seeding medium was removed and replaced with culture medium containing molecules of exposure. Then, the IDCCM platforms were closed and connected to the peristaltic pump to launch the perfusion. During this phase of

exposure, the IDCCM and the Petri dishes were placed in an incubator (37°C, 5% CO₂) and samples performed at 1h, 3h, 5h and 24h after exposure to monitor the disappearance of substrates and the appearance of metabolites. After 24h of exposure, the cells were collected (by trypsin perfusion), the IDCCM and microsystems were washed. At the end of experiment, IDCCM device, microsystems and tubes were sterilized by autoclaving.

2.4 Viability and albumin production of liver cells

Before inoculation and at the end of each experiment, the number of cells was counted on Malassez cell. In the same time, trypan blue staining was performed to estimate the number of hepatic live and dead cells.

Albumin synthesis was investigated by an ELISA Sandwich technique (anti Human Albumin IgG coupled with peroxydase) following our previous protocol (Baudoin et al., 2012).

2.5 Xenobiotic metabolism

2.5.1 Phenacetin and omeprazole metabolism

Phenacetin is a molecule metabolized in paracetamol by CYP1A2. Omeprazole is metabolized in omeprazole sulfone by the CYP3A4 and in 5-hydroxy omeprazole by the CYP2C19 (Tassaneeyakul et al., 2000). The phenacetin (Sigma) was diluted in culture medium at a final concentration of 100 µM and omeprazole (Art molecule) at a final concentration of 60 µM. These molecules were incubated both in dynamic culture conditions (IDCCM) and static culture in Petri dishes.

The quantity of the phenacetin and omeprazole metabolites was estimated by the metabolite ratio (MR) calculated using the following equation:

$$MR (\%) = \frac{\text{Quantity of metabolites (nmoles)}}{\text{Quantity of initial substrate (nmoles)}} \times 100$$

2.5.2 Adsorption of the substrates and metabolites by the IDCCM and Petri dishes

Adsorption of the phenacetin, paracetamol, omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone was tested using the IDCCM device and Petri dishes. The conditions of culture were the same as described previously but no cells were placed in the microsystems and Petri dishes. BSA was used in the culture medium to take into account the unbound fraction of protein in those tests. The medium was sampled after 1h, 3h, 5h and 24h of exposition.

2.5.3 Mass spectrometry analysis

An Agilent QQQ 6460 mass spectrometer with a jet stream electrospray ion source and an Agilent 1200 series fast resolution LC system (Wilmington, DE) was employed to detect phenacetin, acetaminophen, omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone in the culture medium samples. Atrazine was used as internal standard. MassHunter software was used for system control, data acquisition, and data processing. LC separation was performed on a Phenomenex Kinetex C18(2) reverse phase column (150 mm × 3.0 mm i.d., 3 µm particle size) maintained at 30 °C with a gradient program at a flow rate of 0.7 ml/min. The mobile phase A consisted of 100% HPLC grade water with 0.1% formic acid and mobile phase B consisted of 100% HPLC grade acetonitrile. The gradient started with 10% solvent B, held at 10% B for 1min before increased to 95% B in 14 min and then was held at 95% B for 4 min. The column was re-equilibrated with 10% B for 3 min. Total run time was 22 min with a 20 µL injection volume. The mass spectrometer was operated in positive jet stream ESI mode. Nitrogen was used as nebulizer, turbo heater gas, curtain, and collision-activated dissociation gas. The capillary voltage was +4000 V and -4000V. The ion source gas temperatures were 300 °C with flows of 12 L/min. Jetstream gas temperatures were 225 °C with flows of 10 L/min. Atrazine, phenacetin, APAP, omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone were measured by selective reaction monitoring (SRM).

2.6 Mathematical modeling

2.6.1 Pharmacokinetic model

To extract the intrinsic *in vitro* clearances, a pharmacokinetic model was used. The IDCCM platform was described by a four compartment model whereas the Petri was described by a two compartment model (Figure 1: B). The adsorption and desorption of the compound to the Petri walls, the IDCCM walls and perfusion tubes were taken into account *via* the adsorption experiments (*nb*: adsorption experiments are performed without cells). To simplify the set of equations in IDCCM model, the compounds bindings to the serum and albumin proteins were taken into account using the adsorptions experiments in which BSA was used. This led to set the “unbound fraction $f_{u,med}$ ” parameter to 1 as far as the specific binding of the compounds to the proteins were taken into account in the adsorption kinetics. A first order relationship rate was assumed for metabolism because we expected a linear metabolism at the doses used in our experiments. The perfusion was recirculating in the IDCCM and biochips. These assumptions led to the derivation of a set of first order differential equations to model the IDCCM functioning:

$$\frac{dQ_{R1}(t)}{dt} = F \times (C_{Tb}(t) - C_{R1}(t)) - F_b C_{R1}(t) + k_u Q_{ADS(R1)}(t) \quad (\text{Eq.1})$$

$$\frac{dQ_{HepB}(t)}{dt} = F \times (C_{R1}(t) - C_{HepB}(t)) - f_{u,med} \sum CL_{int,invitro,MET=i} C_{HepB}(t) \quad (\text{Eq.2})$$

$$\frac{dQ_{R2}(t)}{dt} = F \times (C_{HepB}(t) - C_{R2}(t)) - F_b C_{R2}(t) + k_u Q_{ADS(R2)}(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \quad (\text{Eq.3})$$

$$\frac{dQ_{Tb}(t)}{dt} = F \times (C_{R2}(t) - C_{Tb}(t)) - F_b C_{Tb}(t) + k_u Q_{ADS(Tb)}(t) \quad (\text{Eq.4})$$

$$\frac{dQ_{ADS}(t)}{dt} = F_b \times (C_{R1}(t) + C_{R2}(t) + C_{Tb}(t)) - k_u \times (Q_{ADS(R1)}(t) + Q_{ADS(R2)}(t) + Q_{ADS(Tb)}(t)) \quad (\text{Eq.5})$$

In which:

- The subscripts $R1$, $R2$, $HepB$, Tb correspond respectively to the two reservoirs, the hepatic biochip and the tubing compartments (Figure 1: B),
- F is the flow rate in the recirculating perfusion system ($25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$),

- C_i is the concentration in the compartment i ($\mu\text{mol.L}^{-1}$),
- Q_i is the amount in the compartment i (μmol),
- C_i and Q_i are linked by the volume V_i as follow $C_i=Q_i/V_i$,
- $CL_{int,in vitro}$ is the *in vitro* intrinsic clearance (to be estimated by the model) (L.s^{-1}),
- fu_{med} is the unbound fraction in the culture medium, it is set to 1,
- $Q_{ADS(R1)}$, $Q_{ADS(R2)}$ and $Q_{ADS(Tb)}$ are the quantities of molecules adsorbed in the circuit (μmol),
- F_b (L.s^{-1}) and k_u (s^{-1}) are the adsorption/desorption rates for non-specific binding on the walls (tubes, reservoirs, biochips) to be estimated by the model,
- $\frac{dQ_{lost}(t)}{dt}$ is the equation modeling the inclusion of samples and secondary metabolism.

The kinetics of the metabolites were described with a similar model. For one metabolite (subscript *Met*), the model is:

$$\frac{dQ_{R1,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{Tb,Met}(t) - C_{R1,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R1,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(R1,Met)}(t) \quad (\text{Eq.6})$$

$$\frac{dQ_{HepB,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R1,Met}(t) - C_{HepB,Met}(t)) + fu_{med,Met} CL_{int,in vitro,Met} \times C_{HepB}(t) \quad (\text{Eq.7})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{R2,Met}(t)}{dt} = & F \times (C_{HepB,Met}(t) - C_{R2,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R2,Met}(t) \\ & + k_{u,Met} Q_{ADS(R2,Met)}(t) - \frac{dQ_{lost,Met}(t)}{dt} \end{aligned} \quad (\text{Eq.8})$$

$$\frac{dQ_{Tb,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R2,Met}(t) - C_{Tb,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{Tb,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(Tb,Met)}(t) \quad (\text{Eq.9})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{ADS,Met}(t)}{dt} = & F_{b,Met} \times (C_{R1,Met}(t) + C_{R2,Met}(t) + C_{Tb,Met}(t)) \\ & - k_{u,Met} \times (Q_{ADS(R1,Met)}(t) + Q_{ADS(R2,Met)}(t) + Q_{ADS(Tb,Met)}(t)) \end{aligned} \quad (\text{Eq.10})$$

In Petri, a simplified model for each parent compound and metabolites using the following equations was solved:

$$\frac{dQ_P(t)}{dt} = -F_b C_P(t) + k_u Q_{ads}(t) - fu_{med} \sum CL_{int,in vitro, MET=i} C_P(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \quad (\text{Eq.11})$$

$$\frac{dQ_{ads}(t)}{dt} = F_b C_P(t) - k_u Q_{ads}(t) \quad (\text{Eq.12})$$

$$\frac{dQ_{P,MET}(t)}{dt} = -F_{b,MET} C_{b,MET}(t) + k_{u,MET} Q_{ads,MET}(t) + fu_{med} CL_{int,invitro,MET} C_b(t) \quad (\text{Eq.13})$$

$$\frac{dQ_{ads,MET}(t)}{dt} = F_{b,MET} C_{P,MET}(t) - k_{u,MET} Q_{ads,MET}(t) \quad (\text{Eq.14})$$

In which

- The subscripts *P* correspond to the Petri reservoir and *MET* to the metabolites.

2.6.2 Parameter estimations and statistical methods

The metabolite formations and parent drug clearances were linked by the terms $CL_x C_x$ in equations 2 and 7 in the IDCCM model and by equations 11 and 13 in Petri. The equations were calculated and solved using the concentrations in mole to respect the stoichiometry. Adsorption rates (F_b , k_u) and the clearances (CL_x) for the parent compounds and the metabolites were estimated and optimized using the experimental results. The parameters were estimated using prior distributions in a Bayesian inference framework (Bois, 2009; Hamon et al., 2013). The data likelihoods were assumed to follow lognormal distribution centered on the model predictions. The prior parameter distributions chosen were vague. Markov chain Monte Carlo simulations were performed using *GNU MCSIM* v5.4.0 (Bois, 2009). The convergence of the posterior solution was checked by the Gelman and Rubin criterion (Gelman and Rubin, 1992) on the last 100,000 iterations of three simulated Markov chains (each of 200,000 iterations in total).

2.7 Prediction of *in vivo* clearances

The *in vitro* intrinsic clearances estimated from the *in vitro* experiments were scaled to correspond to *in vivo* intrinsic clearances. For that purpose, a scaling factor (*SF*) was applied to express the *in vitro* intrinsic clearances in ml/min/kg of body mass. The hepatocellularity was set to 99×10^6 hepatocytes per gram of liver (Barter et al., 2007) and the liver weight to 25 grams per kilogram of body mass in the case of humans (Zuegge et al., 2001). The multiplication of these two quantities defines

the scaling factor (SF) equal to 2475×10^6 hepatocytes per kilogram of body mass for *in vitro/in vivo* extrapolation of the intrinsic clearance.

$$CL_{int,jn vivo} = CL_{int,jn vitro} SF \quad (\text{Eq. 15})$$

Extrapolation of hepatic intrinsic clearance to *in vivo* clearance is usually performed *via* models with a different degree of complexity that describes blood dispersion within the liver (Pang and Rowland, 1977a, 1977b). The three typical models (well-stirred, parallel tube and dispersion models) have been shown to exhibit minor differences for a wide range of drugs (Ito and Houston, 2004). Nevertheless, the parallel tube and the well-stirred models were compared in this study. The hepatic clearance is then given as:

$$CLh_w = \frac{Q_H \times \frac{fu_b}{fu_{med}} \times CL_{int, in vitro} \times SF}{Q_H + \frac{fu_b}{fu_{med}} \times CL_{int, in vitro} \times SF} \quad (\text{Eq.16})$$

$$CLh_{para} = Q_H \left(1 - e^{-\frac{fu_b}{fu_{med}} \frac{CL_{int, in vitro} SF}{Q_H}} \right) \quad (\text{Eq.17})$$

In which the liver blood flow, Q_H , was set to 20 ml/min/kg of human bodyweight (McGinnity et al., 2004). As the adsorption experiments and the clearance experiments were performed with BSA, the unbound fraction of the drug in blood (fu_b) was set to 1 (as for the $f_{u,med}$). The intrinsic clearances estimated from the pharmacokinetic models were then used to derive the hepatic clearances.

3. RESULTS

3.1 Functionality and viability of the hepatocytes

Firstly, we compared the evolution of the hepatocytes number, their viabilities and albumin productions at the end of cultures in Petri and in the IDCCM (Figures 2: A-C). Before seeding and adhesion, the inoculated cell number was counted equal to $385\,749 \pm 50\,110$ cells and the viability $67 \pm 2\%$. At the end of the culture, the number of cells decreased slightly to a value of $279\,333 \pm 53\,872$ cells in Petri and $295\,000 \pm 133\,041$ cells in the IDCCM device (the surface of cell culture was 2 cm^2 in the two conditions of culture). The hepatocyte viability increased slightly between time 0 and the end of culture to reach a value of $85 \pm 11\%$ in Petri and of $77 \pm 7\%$ in the IDCCM. At the end of the culture, the albumin productions were similar in static cultures in Petri dishes ($1044 \pm 77\text{ ng}/10^6\text{ cells/h}$) and dynamic cultures in the IDCCM ($1032 \pm 75\text{ ng}/10^6\text{ cells/h}$).

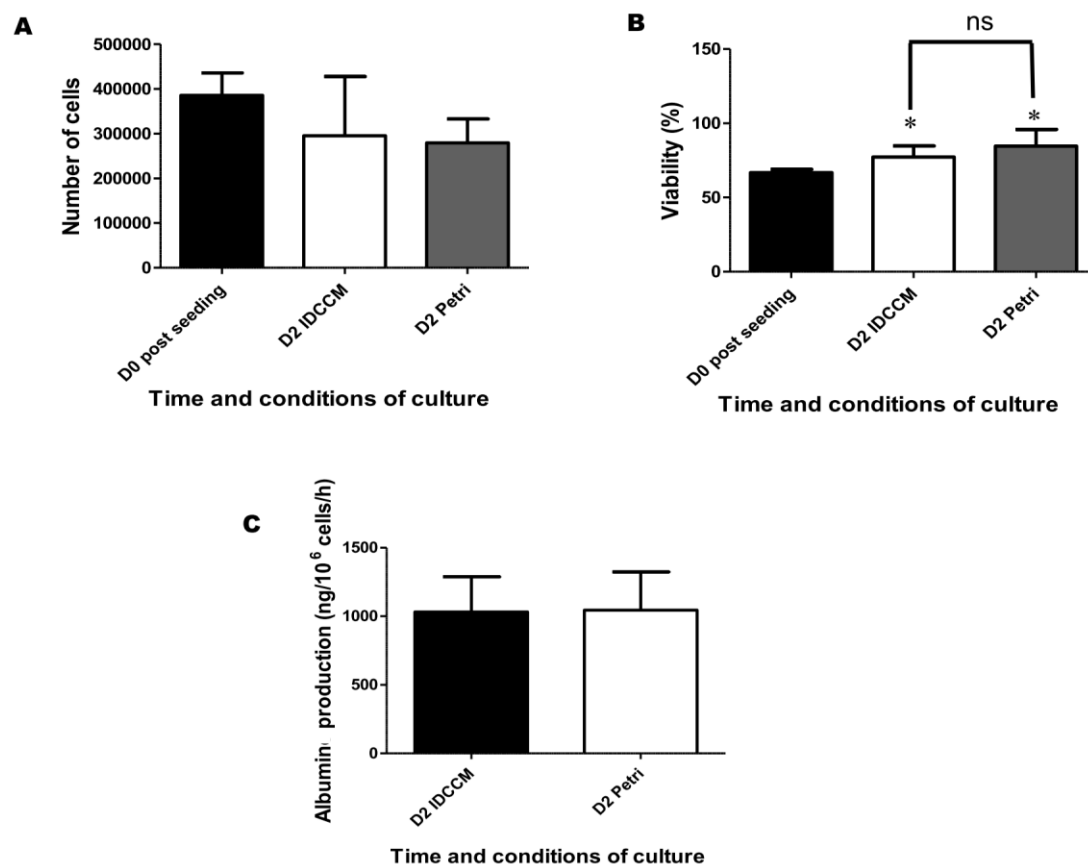


Figure 2: Evolution of the number (A), viability (B) and albumin production (C) of hepatocytes cultivated in the IDCCM device and in Petri dishes. The results were compared before the adhesion step (D0) and one day of culture (D2) (A and B) or after hepatocytes culture in the IDCCM and in Petri (C). Number of cells was evaluated using Malassez cells and viability by Trypan blue test. Viability is expressed in percentage of viable cells relative to the total number of cells. Albumin is expressed in ng/10⁶ cells/h and. Results were compared using one way ANOVA (A and B) and t-test (C). At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences (p_value > 0.05). * indicates a significant difference (p_value < 0.05) compared to the control value.

3.2 Adsorption of the phenacetin, omeprazole and their metabolites

The adsorption of the drugs and of their metabolites was evaluated. Concerning the adsorption of omeprazole and phenacetin, we observed significant differences between Petri and IDCCM conditions after 24h of exposition (Figure 3: A). Both molecules were more adsorbed in the IDCCM than in Petri dishes. Phenacetin and omeprazole adsorption in the IDCCM were $49 \pm 4\%$ and $45 \pm 10\%$ respectively versus $39 \pm 0.2\%$ and $26 \pm 0.6\%$ in Petri dishes respectively.

The adsorption of paracetamol (APAP) and 5 OH omeprazole were not significantly different in the IDCCM ($3.0 \pm 0.1\%$ and $2.9 \pm 0.4\%$ respectively) and Petri configurations of culture ($3.2 \pm 0.3\%$ and $4.2 \pm 1.2\%$) as shown in Figure 3: B. Adsorption of omeprazole sulfone was significantly lower in the Petri configuration ($4.6 \pm 0.8\%$) than after the 24h of exposition in the IDCCM device ($8.6 \pm 0.1\%$).

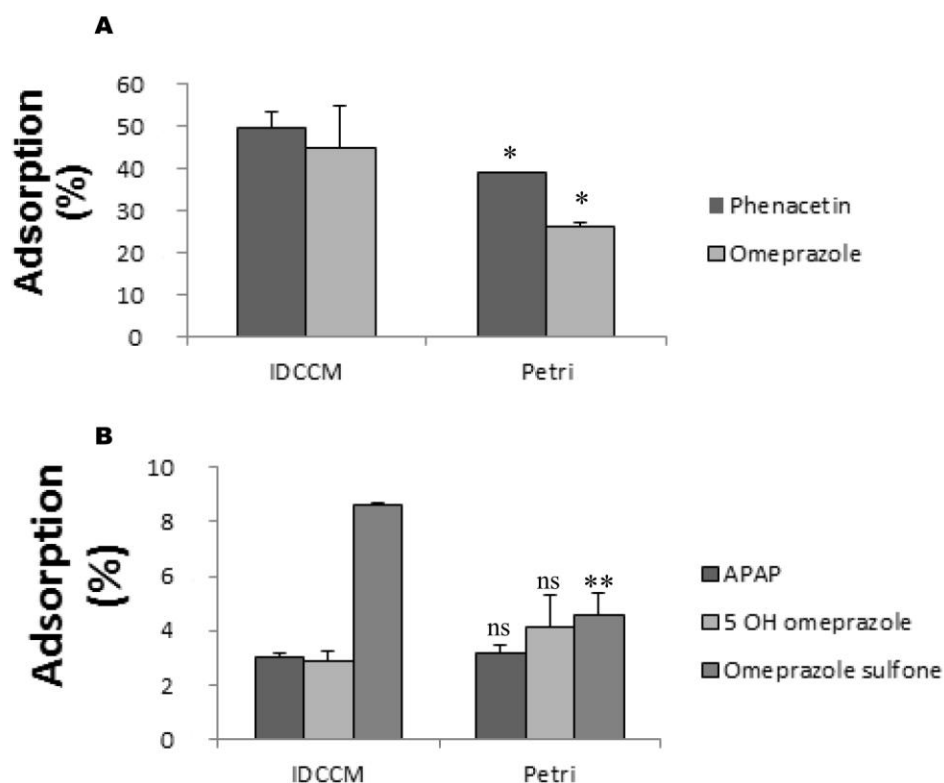


Figure 3: Evaluation of the phenacetin and omeprazole (A) as well as paracetamol, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone (B) adsorptions (%). The quantity of molecule adsorbed was expressed in ratio of the initial quantity of substrates introduced at time 0 of the experiment. These adsorptions were compared during 24h of culture without cells in the IDCCM device and in Petri configurations. Results were compared using t test. At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_value > 0.05$). * and ** indicate a significant difference ($p_value < 0.05$ and $p_value < 0.005$).

3.3 Kinetics of the phenacetin and omeprazole

The phenacetin and omeprazole concentrations decreased during the 24 h of culture in both Petri and IDCCM configurations. Kinetics were faster in the presence of hepatocytes when compared to adsorption experiments. This result confirmed the hepatic metabolism in both Petri and IDCCM. However, the disappearance of phenacetin was significantly more important after 24h of exposition in Petri dishes when compared to IDCCM device (Figure 4: A). At the end of the experiments, the

final concentration of phenacetin was $17 \pm 2 \mu\text{M}$ in Petri and $42 \pm 4 \mu\text{M}$ in the IDCCM. The kinetics of omeprazole were similar in the two configurations of culture (Figure 4: B). The concentrations of omeprazole after 24h of exposition in the IDCCM and Petri configurations were $27 \pm 3 \mu\text{M}$ and $17 \pm 7 \mu\text{M}$ respectively.

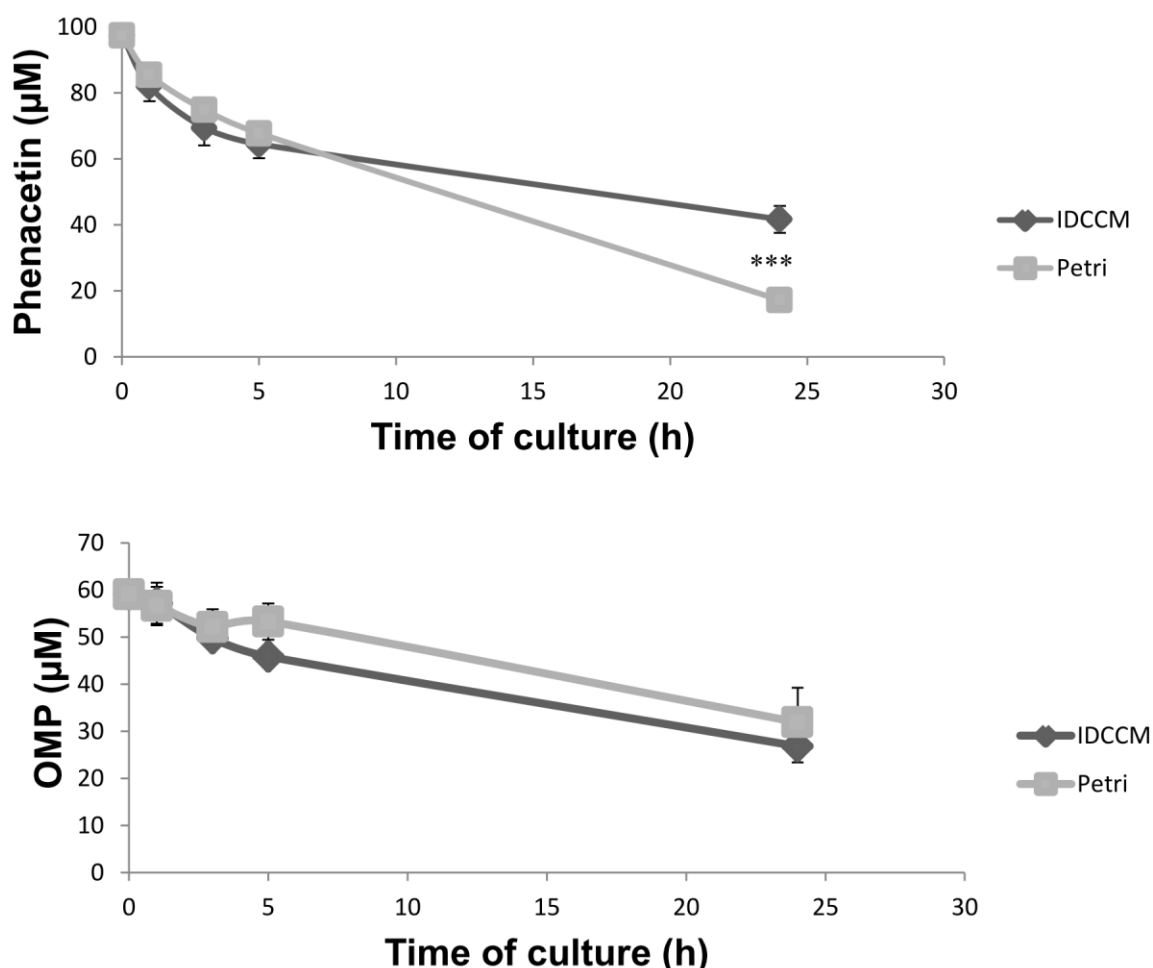


Figure 4: Evolution of the phenacetin (A) and omeprazole (B) concentrations (μM). This evolution was compared during 24h of hepatocytes culture in the IDCCM device and in Petri configuration.

3.4 Metabolism of the phenacetin and omeprazole

The APAP (Figure 5: A), 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone (Figures 5: B and C) productions by the hepatic cells were investigated following phenacetin and omeprazole exposures.

The metabolite ratio of paracetamol increased during the 24 hours of exposition in Petri and in the IDCCM (Figure 5: A). Statistical differences were found between these two conditions at each time of sample. After 1h, 3h, 5h and 24h of exposition, the APAP ratios were $1.25 \pm 0.07\%$, $3.55 \pm 0.07\%$, $4.25 \pm 0.05\%$ and

12.35 ± 0.35% in Petri and 0%, 0.3 ± 0.14%, 0.50 ± 0.14%, 1.65 ± 0.21% in the IDCCM.

The production of 5OH omeprazole from 5h of exposition was significantly higher in Petri than in IDCCM (Figure 5: B) and from 24h for the omeprazole sulfone (Figure 5: C). At 24h of culture, 2.63 ± 1.16 % of 5 OH omeprazole and 2.86 ± 0.73 % of omeprazole sulfone was produced by the cells in Petri versus 0.37 ± 0.18 % and 0.30 ± 0.22 % in the IDCCM respectively.

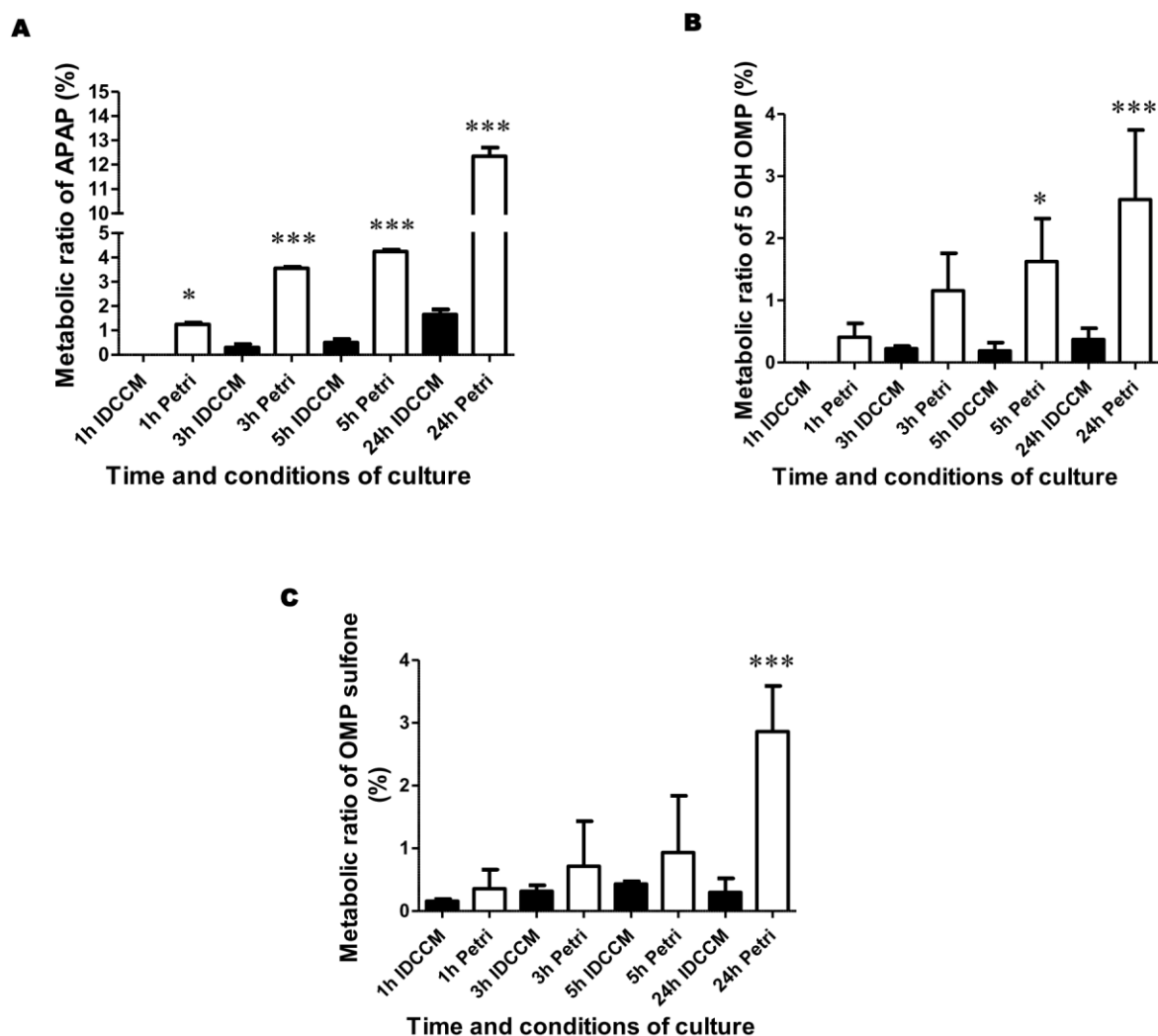


Figure 5: Evolution of the metabolic ratio (%) of APAP (A), 5 OH omeprazole (B) and omeprazole sulfone (C) during 24h of exposition to phenacetin (A) and omeprazole (B and C). Metabolic ratios were calculated as the quantity of metabolites produced divided by the initial quantity of substrates introduced. The concentrations of phenacetin and omeprazole initially introduced were 100 μ M and 60 μ M respectively. Metabolic ratios obtained in the IDCCM and Petri configurations of culture were compared. Three independent experiments were performed. ns indicates no significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$). * and *** indicate a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$ and $p_{\text{value}} < 0.005$) (one-way ANOVA).

3.5 Prediction of hepatic clearances of the phenacetin and omeprazole

In order to check the reliability of the PK model we compared the experimental and modeled data after omeprazole (Figure 6) and phenacetin (Figure 7) exposition of the hepatocytes cultivated in the IDCCM. Then, the experimental data seem effectively approximated by the estimation produced by the PK model.

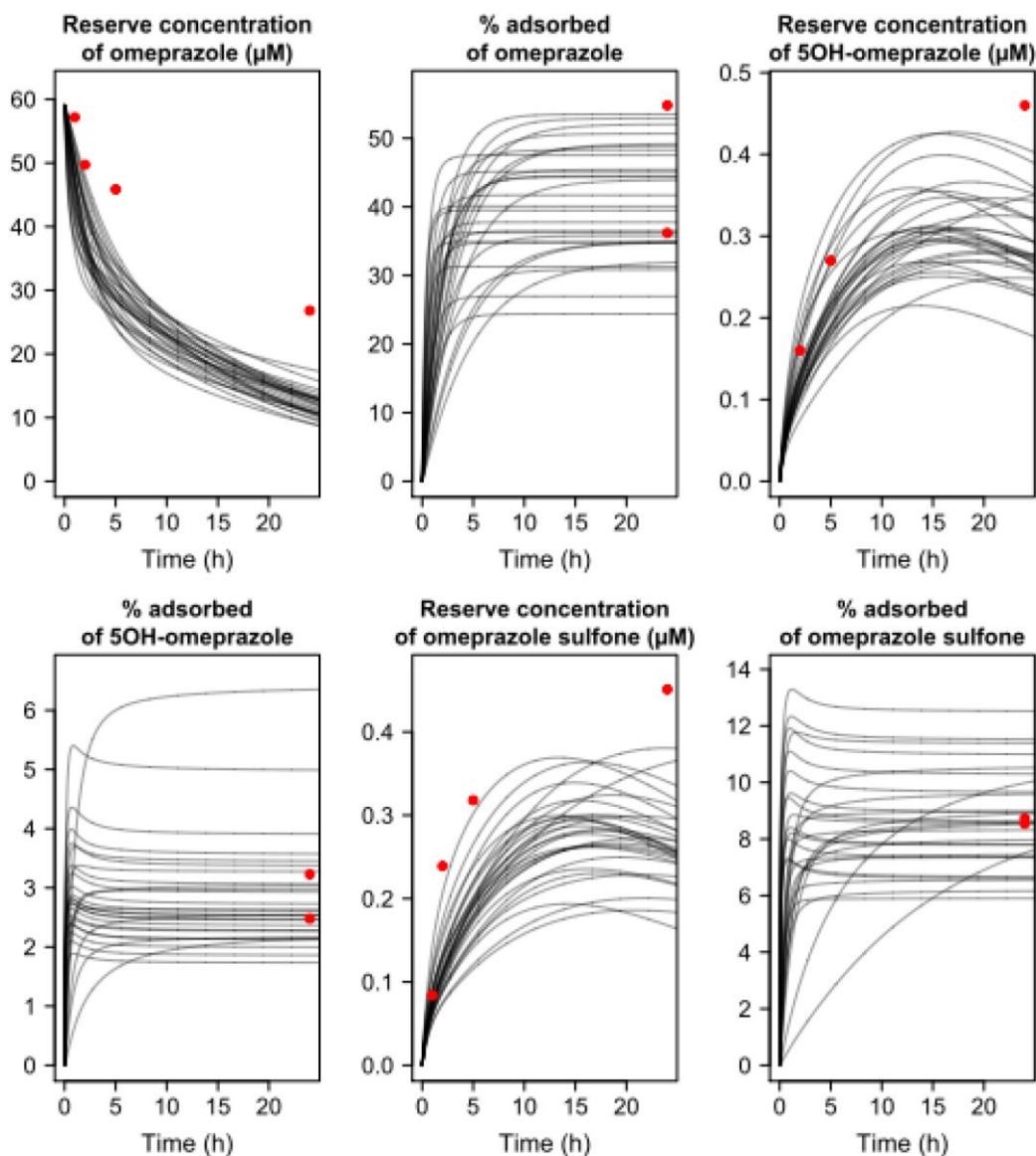


Figure 6: Estimated and experimental concentrations of omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone in the different compartments of the IDCCM device. The concentrations were measured and estimated during 24h of exposition. 60 μM of omeprazole were initially introduced. The black lines represent prediction of the PK model using 30 vectors chosen randomly and a posteriori whereas the red rings represent experimental data.

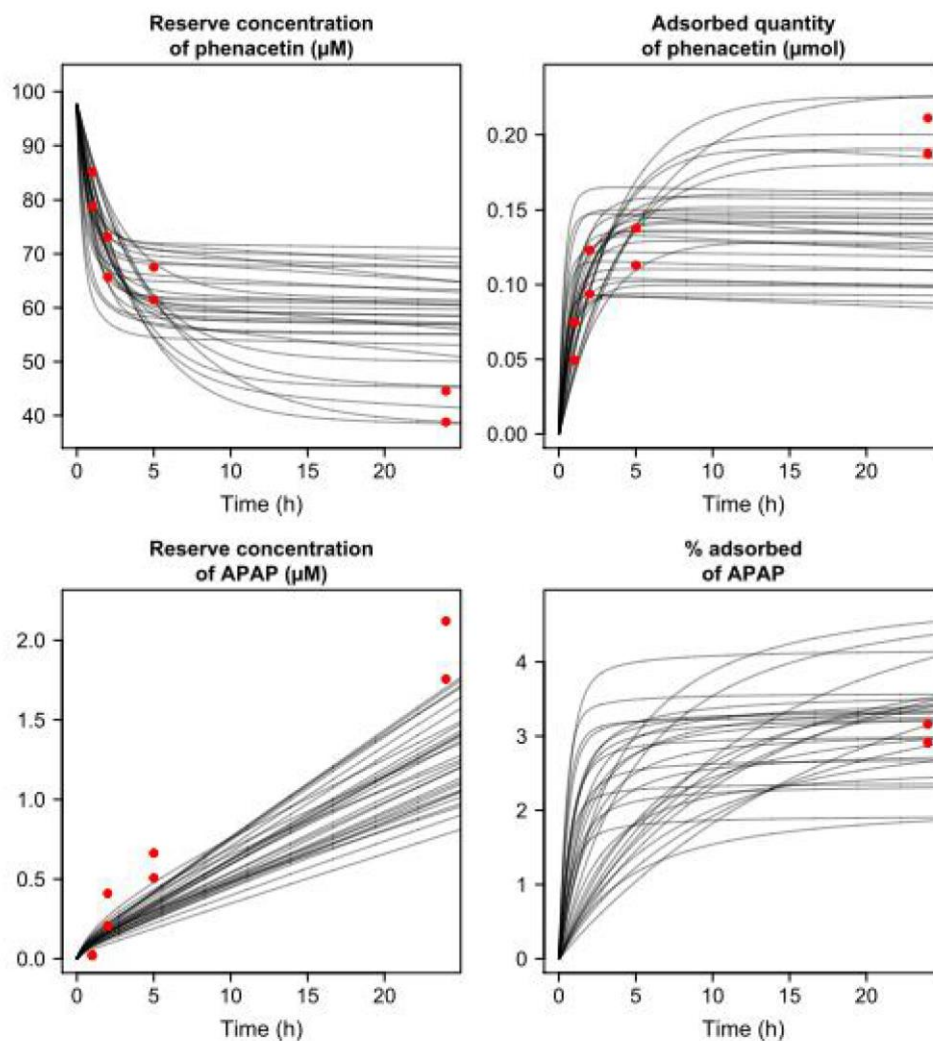


Figure 7: Estimated and experimental concentrations of phenacetin and paracetamol in the different compartments of the IDCCM device. The concentrations were measured and estimated during 24h of exposition. 100 μM of phenacetin were initially introduced. The black lines represent prediction of the PK model using 30 vectors chosen randomly and a posteriori whereas the red rings represent experimental data.

The pharmacokinetic model was run to extract the *in vitro* intrinsic clearances for the phenacetin and the omeprazole as summarized in Table 1. The intrinsic *in vitro* clearances were estimated to be $1.25 \pm 0.16 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ and $0.24 \pm 0.05 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ for the phenacetin in Petri and IDCCM respectively. The intrinsic *in vitro* clearances for omeprazole were equal to $0.46 \pm 0.12 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ and $0.63 \pm 0.13 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ in Petri and IDCCM respectively.

	Estimated from the PK model						Literature data
	CL _{int, in vitro} ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$)		F_b ($\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)		k_u (μs^{-1})		CL _{int, in vitro} ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$)
	IDCCM	Petri	IDCCM	Petri	IDCCM	Petri	
Omeprazole	0.63 (0.13)	0.46 (0.12)	1.41×10^{-7} (1.27×10^{-7})	1.35×10^{-7} (1.92×10^{-7})	1.73×10^{-4} (1.72×10^{-4})	3.85×10^{-4} (5.73×10^{-4})	1.7 ^a
Omeprazole sulfone	0.30 (0.07)	0.15 (0.07)	5.38×10^{-7} (1.43×10^{-6})	1.10×10^{-9} (2.70×10^{-10})	4.39×10^{-3} (1.19×10^{-2})	1.54×10^{-6} (2.20×10^{-6})	0.06 ^c
5 hydroxy Omeprazole	0.33 (0.08)	0.31 (0.10)	5.48×10^{-7} (9.72×10^{-7})	1.11×10^{-9} (2.60×10^{-10})	1.36×10^{-2} (2.3×10^{-2})	7.32×10^{-7} (1.65×10^{-6})	0.91 ^c
Phenacetin	0.24 (0.05)	1.25 (0.16)	1.36×10^{-7} (9.02×10^{-8})	2.95×10^{-8} (3.52×10^{-9})	1.94×10^{-4} (1.66×10^{-4})	1.16×10^{-5} (4.40×10^{-6})	14.7 ^b
Paracetamol	0.24 (0.05)	1.25 (0.16)	5.9×10^{-9} (1.01×10^{-8})	7.58×10^{-10} (1.41×10^{-10})	1.17×10^{-4} (2.17×10^{-4})	1.84×10^{-6} (2.03×10^{-6})	

Table 1: Estimates of the parameters of the kinetic models, mean and (SD);

- a) McGinnity et al., 2004; (data from suspension)
- b) Shibata et al., 2002; (data from suspension)
- c) Lutz et al., 2011; (data from suspension)

Then, using the liver model based on the well stirred assumptions, we predicted hepatic clearances of $2.68 \pm 0.39 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ of bwt and $0.57 \pm 0.13 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ of bwt for the phenacetin from Petri and IDCCM experiments respectively. In parallel, we predicted hepatic clearances of 1.07 ± 0.30 and $1.44 \pm 0.32 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ of bwt in Petri and IDCCM for omeprazole respectively (Table 2). Finally, the well stirred and parallel tube models did not differ in the prediction (data not shown).

	Models predictions (ml/min/kg of BDW)				<i>In vivo</i> Literature data (ml/min/kg of BDW)	Predicted Literature data (ml/min/kg of BDW)
	$CL_{int, in vivo}$		$CLh_{in vivo}$ (well stirred)		$CLh_{in vivo}$	$CLh_{in vivo}$
	IDCCM	Petri	IDCCM	Petri		
Omeprazole	1.56 (0.33)	1.14 (0.32)	1.44 (0.32)	1.07 (0.30)	7.5 ^a 5.8 ^d	3.7 ^a
Omeprazole sulfone	0.75 (0.18)	0.36 (0.18)	0.72 (0.17)	0.36 (0.18)		
5-hydroxy Omeprazole	0.81 (0.21)	0.77 (0.26)	0.78 (0.21)	0.74 (0.25)		
Phenacetin	0.59 (0.13)	3.09 (0.40)	0.57 (0.13)	2.68 (0.39)	11.9 ^d - 19.6 ^b 9.9 ^c	20.8 ^b
Paracetamol	0.59 (0.13)	3.09 (0.40)	0.57 (0.13)	2.68 (0.39)		

Table 2: Prediction of the *in vivo* intrinsic and hepatic clearances using a well-stirred model of equations (15 and 16)

- a) (McGinnity et al., 2004);
- b) (Shibata et al., 2002);
- c) (Riley et al., 2005);
- d) (Paixão et al., 2012);

4. DISCUSSION

4.1 Cell viability and basal metabolism of human cryopreserved hepatocytes

Microsystems and IDCCM device used in this article had already shown their potential using liver cell lines (Bricks et al., 2014; J. M. Prot et al., 2011), rat primary hepatocytes (Baudoin et al., 2013a; Legendre et al., 2013) and, to a lesser extent using human primary hepatocytes (Baudoin et al., 2013b; J.-M. Prot et al., 2011). In particular, we previously showed the overproduction of albumin and the overactivation of CYPs as CYP1A2, CYP2C19 and CYP3A4 when hepatic cell lines and rat primary hepatocytes were grown in microsystems and under a flow of culture medium (Baudoin et al., 2014; Legendre et al., 2013; J. M. Prot et al., 2011).

The dynamic culture of human primary hepatocytes in the IDCCM device during 24h did not induce significant reduction in the cell number and viability. These results appeared consistent with other one obtained with liver cell line (HepG2 C3A) (Bricks et al., 2014) and rat hepatocytes in the IDCCM (Legendre et al., 2013). In addition, the viability in IDCCM was not reduced when compared to Petri cultures.

In parallel, basal metabolism was assessed by the albumin production. The production was similar, closed to $1000 \text{ ng}/10^6 \text{ cells/h}$ when the hepatocytes were cultured in the IDCCM device or in Petri dishes. This value was similar to the production of albumin by hepatocytes *in vivo* estimated to $742 \text{ ng}/10^6 \text{ cells/h}$ (Török et al., 2011). In addition, the albumin production was found 5 to 10 times higher than the production observed in the IDCCM when using the HepG2/C3a ($100\text{-}200 \text{ ng}/10^6 \text{ cells/h}$) (Baudoin et al., 2012; Bricks et al., 2014). The albumin production was also higher than the one measured with rat hepatocytes in biochips and bioreactors after 24h of dynamic culture ($342.9 \pm 109.9 \text{ ng}/10^6 \text{ cells/h}$ using the IDCCM (Legendre et al., 2013), and $145.8 \text{ ng}/10^6 \text{ cells/h}$ using another device called MCmB (Mazzei et al., 2010).

Similar high production of albumin after perfusion in the IDCCM device and in static Petri dishes was found. These results do not confirm previously observed trends. Indeed, it was shown an increase of the albumin production when hepatic

cells were cultured in dynamic conditions in microsystems when compared to cultures in Petri dishes (Bricks et al., 2014). Nevertheless it might be explained by the physiological values found in this study with this set of primary hepatocytes.

4.2 Kinetics and clearances of the phenacetin and omeprazole

It was previously shown that the hepatic culture in the IDCCM was associated with a potential adsorption of substrates, particularly hydrophobic molecules (Baudoin et al., 2013b, 2012; J.-M. Prot et al., 2011). This adsorption is due to the materials properties of the device (polycarbonate) and microsystems (PDMS). It was therefore important to monitor the adsorption of substrates and their metabolites to calculate subsequent clearances of liver cells. The two substrates phenacetin and omeprazole were significantly more adsorbed by the IDCCM device than the Petri dishes. At the opposite, their metabolites were weakly and similarly adsorbed by the Petri dishes and the IDCCM. This is consistent with the hydrophobic character of the parent compounds compared to the chemical properties of more hydrophilic metabolites. Moreover, the incidence of external events leading to a decrease of parent substrate (medium sampling for analysis, secondary metabolism) was taken into account *via* the term Q_{lost} (Eq.11). As a result, we believe that we do not overestimate the clearances in the present model.

The CYP2C19 and CYP3A4 activities were slightly lower after culture in the IDCCM device than in Petri dishes (higher metabolite ratio in Petri configurations). However, the *in vitro* intrinsic omeprazole clearances were similar in Petri and IDCCM conditions. In addition, from both Petri and biochip experiments, the predictions of the hepatic clearance extrapolation were not accurate when compared to *in vivo* experiments. Similar results were found in our previous study which showed that the omeprazole clearances by the human primary hepatocytes was lower after dynamic culture in the IDCCM when compared to the literature data using hepatocytes in suspension (Baudoin et al., 2013b).

The metabolism of phenacetin was higher in Petri when compared to IDCCM (Figure 4: A). This appeared in the opposite of what we obtained previously with HepG2 C3A in which we found a higher metabolism in the IDCCM configuration of culture when compared to Petri (Bricks et al., 2014). Moreover, previous studies

described the maintenance of the levels of mRNA and of the activity of CYP1A2 of hepatic cells (cell lines and rat primary hepatocytes) in IDCCM when compared to Petri conditions of culture (Baudoin et al., 2014; Bricks et al., 2014). Nevertheless the intrinsic *in vitro* clearances and hepatic clearances predictions, resulting from both Petri and biochips, remained in the same range of values and under-predicted *in vivo* values (Table 2).

The present results demonstrated that the human primary hepatocytes functionality was not enhanced by the dynamic conditions of culture after 24h of exposition. Consequently, the overall predictions of the intrinsic *in vitro* and the *in vivo* hepatic clearances were similar in both cultures modes, even lower in the IDCCM than in Petri configurations of culture for the phenacetin clearance. When compared to *in vivo* data, the omeprazole and phenacetin clearances were under predicted by a factor 10 and 20. The predictions resulting from intrinsic *in vitro* clearances extrapolated from human hepatocyte culture suspension appeared better (as shown in Tables 1 and 2). Using hepatocyte suspension, the prediction of the hepatic clearances and the literature data appeared in the order of magnitude (Table 2). Therefore, in the present culture format, the IDCCM configuration did not provide competitive advantage when compared to other available *in vitro* tools and models to predict phenacetin and omeprazole clearances.

4.3 Microfluidic cultures in IDCCM for human hepatic metabolism

The primary hepatocytes used in the experiments seemed less sensitive to flow when compared to other teams data with primary hepatocytes (Mazzei et al., 2010; Vinci et al., 2011). This difference may be due to the particular sensitivity of the hepatocytes linked to their origins and initial treatment (interindividual variability, hepatocytes in cryovials/fresh hepatocytes) (Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008; Iwatsubo et al., 1997) and the conditions of culture different between the article cited (including material of the microsystems, seeding density, culture time, medium volume and composition, oxygen concentration, flow rate and shear stress) (Mazzei et al., 2010; Vinci et al., 2011). In the protocol used in present study (24h of dynamic culture), there is not any benefit of the IDCCM cultures when compared to Petri using human primary cells for both omeprazole and phenacetin. Basal albumin metabolism, kinetics and clearances of the drugs were similar in both cultures modes even lower

after the dynamic culture in the IDCCM. Furthermore, a larger adsorption in IDCCM configurations was observed. This conclusion conducted to evaluate more complex tissue engineered hepatic cultures in IDCCM when compared to our basic biochip unit experiments (Prot et al., 2011). In addition, Novik and its colleagues, demonstrated a higher performance of human primary hepatocytes when cultivated in co-culture with non-parenchymal cells and in dynamic conditions in their microdevices (Novik et al., 2010). Therefore, the biochip and platform designs associated with the cell culture model might be an important issue. In addition, the effect of longer time of culture needs to be evaluated on slow but highly metabolized compounds. Indeed, the benefit of the maintenance of mRNA levels and thus a potential higher hepatic functionality in later step should illustrate the potential of the IDCCM when compared to Petri. Metabolisms of phenacetin and omeprazole were probably too fast to justify the use of IDCCM device for metabolism application. The CYPs activities over longer periods (96h of culture) of rat hepatocytes culture in the IDCCM was already confirmed (Legendre et al., 2013). Similarly several researches have shown that bioreactors, either at milliscale or microscale, were suitable to maintain hepatic functionality up to several weeks. Therefore, future study will be required to evaluate the long term performance of human primary hepatocyte in the IDCCM devices.

5. CONCLUSION

This study confirmed that the IDCCM device did not induce alteration of the viability of primary human hepatocytes cultured during 48h including 24h of perfusion. On contrary to what was highlighted previously for rat primary hepatocytes and hepatic cell lines, the activities of CYP1A2, CYP2C19 and CYP3A4 did not increase in dynamic conditions and were equivalent in Petri and in IDCCM during short periods of culture. This led to predict quite similar hepatic clearances of phenacetin and omeprazole from both Petri and biochip *in vitro* experiments. However, the investigation of the metabolic activities of hepatocytes cultivated in coculture with non-parenchymal cells in the IDCCM on long term culture (time up to 96h or more) would be particularly interesting to confirm/infirm the IDCCM interest for drugs metabolism with low clearances. Indeed, maintenance of the functionality of human primary hepatocytes on a long term is still challenging to allow accurately the *in vivo* predictions of drugs metabolism obtained from *in vitro* data.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche et l’Innovation” at the “Université de Technologie de Compiègne” via the project ToxOnChip.

REFERENCES:

- Allen, J.W., Bhatia, S.N., 2005. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 253–262. doi:10.1002/bit.10569
- Barter, Z.E., Bayliss, M.K., Beaune, P.H., Boobis, A.R., Carlile, D.J., Edwards, R.J., Brian Houston, J., Lake, B.G., Lipscomb, J.C., Pelkonen, O.R., Tucke, G.T., Rostami-Hodjegan, A., 2007. Scaling Factors for the Extrapolation of In Vivo Metabolic Drug Clearance From In Vitro Data: Reaching a Consensus on Values of Human Micro-somal Protein and Hepatocellularity Per Gram of Liver. *Curr. Drug Metab.* 8, 33–45. doi:10.2174/138920007779315053
- Baudoin, R., Alberto, G., Legendre, A., Paullier, P., Naudot, M., Fleury, M.-J., Jacques, S., Griscom, L., Leclerc, E., 2013a. Investigation of expression and activity levels of primary rat hepatocyte detoxication genes under various flow rates and cell densities in microfluidic biochips. *Biotechnol. Prog.* doi:10.1002/btpr.1857
- Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Legallais, C., Leclerc, E., 2012. Parallelized microfluidic biochips in multi well plate applied to liver tissue engineering. *Sens. Actuators B Chem.* 173, 919–926. doi:10.1016/j.snb.2012.06.050
- Baudoin, R., Legendre, A., Jacques, S., Cotton, J., Bois, F., Leclerc, E., 2014. Evaluation of a liver microfluidic biochip to predict in vivo clearances of seven drugs in rats. *J. Pharm. Sci.* 103, 706–718. doi:10.1002/jps.23796
- Baudoin, R., Prot, J.M., Nicolas, G., Brocheton, J., Brochet, C., Legallais, C., Benech, H., Leclerc, E., 2013b. Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 43, 140–152. doi:10.3109/00498254.2012.706725
- Bois, F.Y., 2009. GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models. *Bioinformatics* 25, 1453–1454. doi:10.1093/bioinformatics/btp162
- Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P.M., Leclerc, E., 2014. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* doi:10.1016/j.tiv.2014.02.005
- Choi, S.H., Fukuda, O., Sakoda, A., Sakai, Y., 2004. Enhanced cytochrome P450 capacities of Caco-2 and Hep G2 cells in new coculture system under the static and perfused conditions: evidence for possible organ-to-organ interactions against exogenous stimuli. *Mater. Sci. Eng. C, International Symposium on Cell Biomechanics and Tissue Engineering at the University of Tokyo* 24, 333–339. doi:10.1016/j.msec.2003.12.002
- Ebrahimkhani, M.R., Neiman, J.A.S., Raredon, M.S.B., Hughes, D.J., Griffith, L.G., n.d. Bioreactor technologies to support liver function in vitro. *Adv. Drug Deliv. Rev.* doi:10.1016/j.addr.2014.02.011
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457–472. doi:10.1214/ss/1177011136
- Ghaemmaghami, A.M., Hancock, M.J., Harrington, H., Kaji, H., Khademhosseini, A., 2012. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discov. Today* 17, 173–181. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.029

- Guillouzo, A., Guguen-Guillouzo, C., 2008. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 1279–1294. doi:10.1517/17425255.4.10.1279
- Hamon, J., Jennings, P., Bois, F.Y., 2013. Integration of Omics Data and Systems Biology Modeling: Effect of Cyclosporine A on the Nrf2 Pathway in Human Renal Kidneys Cells. *ArXiv13124744 Q-Bio*.
- Huh, D., Hamilton, G.A., Ingber, D.E., 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 21, 745–754. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005
- Ito, K., Houston, J.B., 2004. Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm. Res.* 21, 785–792.
- Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C.E., Tyson, C.A., Sugiyama, Y., 1997. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.* 73, 147–171.
- Kim, H.J., Ingber, D.E., 2013. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr. Biol.* 5, 1130–1140. doi:10.1039/C3IB40126J
- Legendre, A., Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Naudot, M., Bricks, T., Brocheton, J., Jacques, S., Cotton, J., Leclerc, E., 2013. Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. *J. Pharm. Sci.* 102, 3264–3276. doi:10.1002/jps.23466
- Mazzei, D., Guzzardi, M.A., Giusti, S., Ahluwalia, A., 2010. A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 127–137. doi:10.1002/bit.22671
- McGinnity, D.F., Soars, M.G., Urbanowicz, R.A., Riley, R.J., 2004. Evaluation of Fresh and Cryopreserved Hepatocytes as in Vitro Drug Metabolism Tools for the Prediction of Metabolic Clearance. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1247–1253. doi:10.1124/dmd.104.000026
- Nahmias, Y., Berthiaume, F., Yarmush, M.L., 2007. Integration of Technologies for Hepatic Tissue Engineering, in: Lee, K., Kaplan, D. (Eds.), *Tissue Engineering II, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 309–329.
- Novik, E., Maguire, T.J., Chao, P., Cheng, K.C., Yarmush, M.L., 2010. A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1036–1044. doi:10.1016/j.bcp.2009.11.010
- Paixão, P., Gouveia, L.F., Morais, J.A.G., 2012. Prediction of the human oral bioavailability by using in vitro and in silico drug related parameters in a physiologically based absorption model. *Int. J. Pharm.* 429, 84–98. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.03.019
- Pang, K.S., Rowland, M., 1977a. Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the “well-stirred” model over the “parallel tube” model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5, 655–680.
- Pang, K.S., Rowland, M., 1977b. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a “well-stirred” model and a “parallel tube” model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5, 625–653.

- Polli, J.E., 2008. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J.* 10, 289–299. doi:10.1208/s12248-008-9027-6
- Prot, J.M., Aninat, C., Griscom, L., Razan, F., Brochot, C., Guillouzo, C.G., Legallais, C., Corlu, A., Leclerc, E., 2011. Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1704–1715. doi:10.1002/bit.23104
- Prot, J.-M., Bunescu, A., Elena-Herrmann, B., Aninat, C., Snouber, L.C., Griscom, L., Razan, F., Bois, F.Y., Legallais, C., Brochot, C., Corlu, A., Dumas, M.E., Leclerc, E., 2012. Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic “on chip” approaches: application to acetaminophen injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 270–280. doi:10.1016/j.taap.2011.12.017
- Prot, J.-M., Videau, O., Brochot, C., Legallais, C., Bénech, H., Leclerc, E., 2011. A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening. *Int. J. Pharm.* 408, 67–75. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.054
- Riley, R.J., McGinnity, D.F., Austin, R.P., 2005. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 1304–1311. doi:10.1124/dmd.105.004259
- Shibata, Y., Takahashi, H., Chiba, M., Ishii, Y., 2002. Prediction of hepatic clearance and availability by cryopreserved human hepatocytes: an application of serum incubation method. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 30, 892–896.
- Tassaneeyakul, W., Tassaneeyakul, W., Vannaprasaht, S., Yamazoe, Y., 2000. Formation of omeprazole sulphone but not 5-hydroxyomeprazole is inhibited by grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 139–144. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00122.x
- Tilles, A.W., Baskaran, H., Roy, P., Yarmush, M.L., Toner, M., 2001. Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 379–389.
- Török, E., Lutgehetmann, M., Bierwolf, J., Melbeck, S., Düllmann, J., Nashan, B., Ma, P.X., Pollok, J.M., 2011. Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: A promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. *Liver Transpl.* 17, 104–114. doi:10.1002/lt.22200
- Van Midwoud, P.M., Merema, M.T., Verpoorte, E., Groothuis, G.M.M., 2010. A microfluidic approach for in vitro assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices. *Lab. Chip* 10, 2778–2786. doi:10.1039/c0lc00043d
- Vinci, B., Duret, C., Klieber, S., Gerbal-Chaloin, S., Sa-Cunha, A., Laporte, S., Suc, B., Maurel, P., Ahluwalia, A., Daujat-Chavanieu, M., 2011. Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: Medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol. J.* 6, 554–564. doi:10.1002/biot.201000326
- Weibel, D.B., Whitesides, G.M., 2006. Applications of microfluidics in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol., Model systems / Biopolymers* 10, 584–591. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.016

Zuegge, J., Schneider, G., Coassolo, P., Lavé, T., 2001. Prediction of hepatic metabolic clearance: comparison and assessment of prediction models. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 553–563. doi:10.2165/00003088-200140070-00006

CHAPITRE 6 : ETUDE DE L'ABSORPTION ET DU METABOLISME INTESTINAL ET HEPATIQUE DE LA PHENACETINE ET DE L'OMEPRAZOLE PAR UNE COCULTURE DE CACO-2 TC7 ET D'HEPATOCYTES PRIMAIRES HUMAINS

Nous avons vu dans le deuxième article de ce manuscrit que la perfusion d'hépatocytes primaires humains durant 24h au sein du dispositif IDCCM ne permettait pas de retrouver les résultats obtenus après utilisation de cellules hépatiques de lignée (HepG2 C3A) [216]. En effet, nous avons montré que soumettre les HepG2 C3A à des conditions dynamiques de culture entraîne une augmentation de leur production d'albumine et de leur activité du CYP1A2 comparativement à celle obtenue après simple culture dans des boîtes de Pétri [13]. Lorsque les cellules hépatiques de lignée ont été remplacées par des hépatocytes primaires humains, les performances métaboliques de ces cellules ont été similaires voire meilleures lorsqu'elles ont été cultivées en monocouche dans des boîtes de Pétri que lorsqu'elles ont été perfusées au sein des microsystèmes [216]. Ces résultats confirment ceux obtenus lors d'études précédentes basées sur l'utilisation d'hépatocytes primaires humains [181,182] mais sont à l'opposé de ceux obtenus dans d'autres études rapportant un effet stimulant du flux de culture sur des hépatocytes primaires humains en particulier sur le CYP1A2 de ces cellules [7].

Après avoir montré que la culture dynamique des hépatocytes dans des microsystèmes ne permettait pas d'observer une augmentation de l'activité du CYP1A2, CYP2C19 et CYP3A4, il était intéressant d'étudier les interactions potentielles entre cellules intestinales et hépatocytes primaires humains. Nous avons en effet constaté précédemment dans le cadre d'une coculture associant une barrière intestinale (Caco-2 TC7) à la culture dynamique de HepG2 C3A dans des microsystèmes (avec le dispositif IIDMP), une augmentation de l'activité du CYP1A2 des cellules hépatiques comparativement à celle obtenue après monoculture dynamique des HepG2 C3A au sein de l'IDCCM [13]. Cet effet de la coculture était de plus lié à une augmentation de la production d'albumine par les cellules hépatiques [13]. Il était donc intéressant de voir si nous observions ce type de phénomène

lors d'une coculture de cellules intestinales (Caco-2 TC7) et d'hépatocytes primaires humains même si ces hépatocytes semblaient peu sensibles à la culture dynamique.

Pour cela, nous avons choisi de comparer les résultats obtenus après coculture dynamique des Caco-2 TC7 et des hépatocytes primaires humains (au sein de l'IIDMP) à ceux obtenus après monoculture des Caco-2 TC7. Nous avons aussi comparé nos résultats avec ceux obtenus après monoculture des hépatocytes primaires au sein de l'IDCCM comme décrits dans la publication précédente [216].

Les résultats obtenus lors des expérimentations *in vitro* effectuées avec l'IIDMP ont de plus été intégrés au sein d'un modèle PK. Cette démarche nous a permis de calculer les clairances et les biodisponibilités orales associées à l'absorption et au métabolisme intestinal et hépatique de l'oméprazole et de la phénacétine. Par ce biais, nous avons cherché à démontrer la pertinence de notre dispositif permettant de mimer les effets de premiers passages hépatiques mais aussi intestinaux, peu souvent pris en compte dans le cadre des études *in vitro* et *in silico* de biodisponibilités.

COMPARISON OF OMEPRAZOLE AND PHENACETIN FIRST PASS METABOLISM USING HUMAN PRIMARY CRYOPRESERVED HEPATOCYTES AND CACO-2 TC7 IN MICROSCALE BIOREACTOR

Thibault Bricks¹, Jérémy Hamon¹, Marie José Fleury¹, Rachid Jellali¹, Franck Merlier², Yves Edouard Herpe³, Jérôme Cotton⁴, Alexandre Seyer⁴, Jean-Marc Regimbeau⁵, Frédéric Bois^{6,7}, Eric Leclerc^{1*}

¹ CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Université de Technologie de Compiègne, France

² CNRS FRE 3580, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, Université de Technologies de Compiègne, France

³ Biobanque de Picardie, CHU AMIENS - Avenue René Laënnec, 80480 SALOUEL – France

⁴ Profilomic, 31 rue d'Aguesseau, 92100, Boulogne-Billancourt, France

⁵ Département de Chirurgie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire et Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁶ Chair of Mathematical Modeling for Systems Toxicology, Université de Technologie de Compiègne, Centre de Recherche de Royallieu, 60205 Compiègne Cedex

⁷ INERIS/DRC/VIVA/METO, Verneuil en Halatte, France.

*Correspondence should be addressed to
Eric Leclerc

CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Université de Technologie de Compiègne, France

Email: eric.leclerc@utc.fr

ABSTRACT

A new *in vitro* microfluidic platform (Integrated Insert Dynamic Microfluidic Platform, IIDMP) allowing the coculture of intestinal cells Caco-2 TC7 and of human primary hepatocytes was used to test the absorption and first pass metabolism of two drugs : phenacetin and omeprazole. The metabolism of these drugs by CYP1A2, CYP2C19 and CYP3A4 was evaluated by the calculation of bioavailabilities and of intrinsic clearances using a pharmacokinetic (PK) model. To demonstrate the usefulness of the device and of the PK model, predictions were compared with the *in vitro* and *in vivo* results of the literature. Based on the IIDMP experiments, we predicted hepatic *in vivo* clearances of phenacetin and omeprazole in the IIDMP of 3.10 ± 0.36 and 1.46 ± 0.25 ml/min/kg of bodyweight respectively. This appeared lower than *in vivo* observed data with values ranging between 11.9-19.6 and 5.8-7.5 ml/min/kg of bodyweight respectively. Then, hepatic and intestinal clearances calculated led to predict oral bioavailability of 0.85 and 0.77 for phenacetin and omeprazole versus 0.92 and 0.78 using separate data of simple monoculture of Caco-2 TC7 and hepatocytes in Petri dishes. When compared to *in vivo* data, we overestimated the results of oral bioavailability equal to 0.37 and 0.71 respectively.

In parallel, the dynamic coculture of intestinal and hepatic cells was linked with a decrease of intestinal permeability with values of transepitheliale electric resistance of $148.4 \pm 22 \Omega \cdot \text{cm}^2$ after coculture in the device versus $241.10 \pm 28.89 \Omega \cdot \text{cm}^2$ when the Caco-2 TC7 were grown in monoculture. Finally, we have demonstrated that the use of this device allows the observation of possible interactions between intestinal and hepatic cells. Moreover, we have shown the feasibility of the coculture device allowing the integration of intestinal absorption but also of intestinal and hepatic metabolism in a single model. However, further experiments are needed to conclude on the reliability of the device and model to predict oral bioavailability and intestinal first pass metabolism.

1. INTRODUCTION

The intestine and the liver are two organs playing a major role in the processes of absorption, distribution, metabolism and excretion of xenobiotics (ADME process). Indeed, the oral absorption of xenobiotics is widely prevails compared to subcutaneous, pulmonary or parenteral routes of absorption. Following oral absorption, xenobiotics are then potentially absorbed primarily from the small intestine, because of its particular physiological properties such as folds, villi and microvilli. This organ may further metabolize some of these xenobiotics through an intestinal first-pass effect (Betton, 2013; Kato, 2008). Xenobiotics and/or metabolites are then mainly directed to the liver where they are metabolized, potentially excreted and more generally detoxified.

These intestinal and hepatic first pass effects play a major role in the reduction of the bioavailability of drugs and xenobiotics which makes the study of these two organs particularly interesting, not only in the context of the development of new therapeutic substances, but also for toxicity testing (Carrière et al., 2001; Thummel et al., 1997). For this purpose, it is possible to study their functionalities with experiments performed *in vivo* and *ex vivo*. However, these methods are expensive, pose ethical problems and fail to accurately study the cellular responses of the intestine and liver (Antunes et al., 2013; Groneberg et al., 2002; Soldatow et al., 2013). For these reasons, many *in vitro* models are currently used to mimic intestinal and hepatic functionality. Most of these methods consist in the culture of cell lines or primary cells (animal/human) in Petri dishes and with transwell inserts. Although these methods are commonly used to monitor the metabolism and toxicity of xenobiotics on a short term, they have the disadvantage of not recreate the *in vivo* cellular environment. This leads to a rapid dedifferentiation of primary cells and low metabolic activity of the cell lines that limits actually the predictability of these models (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010).

To overcome these problems, a number of *in vitro* models were established in recent years. One of these models consists of culturing cells in microsystems. This culture has many advantages such as the ability to better control the microenvironment and the differentiation state of the cells and/or continuously renewing the culture medium (Ghaemmaghami et al., 2012). Several types of

cultures of “organ on a chip” such as liver (Leclerc et al., 2004; Midwoud et al., 2011), kidney (Choucha Snouber et al., 2011; Ferrell et al., 2010; Jang et al., 2013), lung (Hoganson et al., 2014), brain (Millet and Gillette, 2012), intestine (Imura et al., 2009; Kim and Ingber, 2013) were proposed in the literature. Furthermore, organ to organ interaction model were also presented to reproduce the first pass metabolism between intestine and liver (Bricks et al., 2014b; Mahler et al., 2009; Sin et al., 2004). One such device known as IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) allows the dynamic coculture of an intestinal barrier and of liver cells in microsystems. The safety and functionality of this device by growing cell lines (Caco-2 TC7 and HepG2 C3A) were demonstrated in our previous study (Bricks et al., 2014b). Furthermore, cells cultured in this system showed a better activity of xenobiotic metabolizing enzymes (EMX) of phase I (CYP1A) than when they were cultured in Petri dishes (Bricks et al., 2014b; J. M. Prot et al., 2011).

However, the HepG2 C3A cell lines have low metabolic capacities even if their use is relevant to develop a new bioreactor (Bricks et al., 2014b). To demonstrate the potential of the IIDMP, the present study proposes to test this device by the coculture of intestinal cell line (Caco-2 TC7) and human primary hepatocytes. For these purposes, the absorption and transport of drugs as well as the metabolic activity of some EMX of phase I were tested after dynamic coculture of cells. The activities of these enzymes such as CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4, and the absorption were investigated using phenacetin and omeprazole as substrates and compared to that obtain after the static culture of Caco-2 TC7 in Petri. Then, the clearances and the oral bioavailability of these two drugs were calculated using a mathematical model and compared with the data obtained from *in vitro* and *in vivo* literature to discuss the IIDMP potential.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Caco-2 TC7 cells and culture medium

Intestinal cell line Caco-2 TC7 was provided from Dr. M. Rousset *via* Dr Anton Gay (INSERM U178, Villejuif, France, Lasalle Beauvais, France). The culture medium used contained MEM (Minimal Essential Medium) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% HEPES (hydroxy-ethylpiperazine-N-2 ethanesulfonic acid 0, 1M), 1% of non-essential amino acids (100x), 100 units / ml penicillin - streptomycin , 1 % L-Glutamine 200 mM and 1% sodium pyruvate 100 mM. The MEM and all components were purchased from Gibco. Maintenance of Caco-2 TC7 cells was performed in 75 cm² flasks at 37°C and in an atmosphere with 5% CO₂. The medium was changed every other day.

When Caco-2 TC7 cells reached 80 % confluence, they were detached using trypsin-EDTA (0.25 %, 7 mM, Gibco, France) and seeded directly into polycarbonate membranes (6-well formats, 24 mm in diameter and 0.4 µm pores, TC treated, Sigma Aldrich SA, Saint Quentin Fallavier, France). The seeding density was set at 100 000 cells/cm² and the seeding was performed 21 days before the beginning of the experiments.

To limit the variability of the results obtained in each experiment, the Caco-2 TC7 cells were used between passage 25 and 45. The culture medium used for the Caco-2 TC7 cells during the step of seeding was the same than used in the cells culture not only in inserts but also in microsystems.

2.2 Primary human hepatocytes culture and medium

Primary human hepatocytes storage in cryovials were purchased from Picardie biobank (Amiens, France) and Biopredic (Rennes, France). The culture medium was purchased from Lonza (HBM Medium TM, Lonza CC- 3199) and supplemented with ascorbic acid, albumin, bovine serum and free fatty acids (FAF - BSA), factor human epidermal growth (hEGF), transferrin, insulin and Gentamicin / Amphotericin (HCM TM KitTM SingleQuotes, CC-4182). At the beginning of the experiments, the human primary hepatocytes, were thawed and seeded according to the protocol established by Lonza (h NHEPS - Cells TM Instructions for Use). The contents of the cryovials from two different donors were mixed at each experiment. The seeding density in the

Petri dishes and microsystems was set at 125 000 cells/cm². The seeding medium contained 2% of fetal calf serum and had the same composition than the culture medium (HBM) described previously. After the step of cell adhesion (overnight), the seeding medium was replaced by basal medium without serum addition.

2.3 Coculture (IIDMP) device

The device of coculture combining function of intestinal barrier and hepatic metabolism was called IIDMP for "Integrated Dynamic Insert in a Microfluidic Platform". The IIDMP concept and principle were described in detail previously (Bricks et al., 2014b) and allows the coculture of intestinal and hepatic cells in a culture medium constantly renewed. This device has the appearance of a polycarbonate box and is composed of a succession of subunits. Each subunit allows (Figure 1: A):

- The culture of intestinal cells on 6-wells inserts acting as intestinal barrier and placed in the intestinal compartment of the device.
- The culture of liver cells in microchips in the liver compartment of the device. The microsystems design and use was described previously (Baudoin et al., 2013a, 2013b, 2012; J. M. Prot et al., 2011; J.-M. Prot et al., 2011; Prot et al., 2012).

Each subunit is composed of the association of an insert and a microsystem linking two wells (Figure 1: A). The insert is placed in the first (well 1) and defines an apical pole (intestinal compartment) corresponding to the light of the gastrointestinal tract *in vivo* and a basal pole allowing the exchange of culture medium between the intestinal barrier and the hepatic compartment. The microsystem connects the first and the second well (well 2) acting as reservoir. The basal compartment of the first well, the microsystem and the second well constitute the hepatic compartment of each subunit. The overall IIDMP device consists of 3 subunits and allows the culture of 3 inserts and 3 microsystems simultaneously. Volumes of culture medium placed in the apical insert were 1.5 ml, 8.5 ml below the insert and 2.5 ml in the well 2. Perfusion of microsystems is made possible by the circulation of culture medium from the second well to the basal compartment of the first well. The perfusion fluid is provided by a cover connected to a peristaltic pump *via* PTFE (polytetrafluoroethylene) pipes and the flow rate was fixed at 25µl/min. This cover

allows to hermetically close the IIDMP device and to take samples through ports from the intestinal and hepatic compartment. The other components of the box are silicone gaskets sealing the device, a face center defining each well subunits and a lower face for fixing the microsystems (Bricks et al., 2014b).

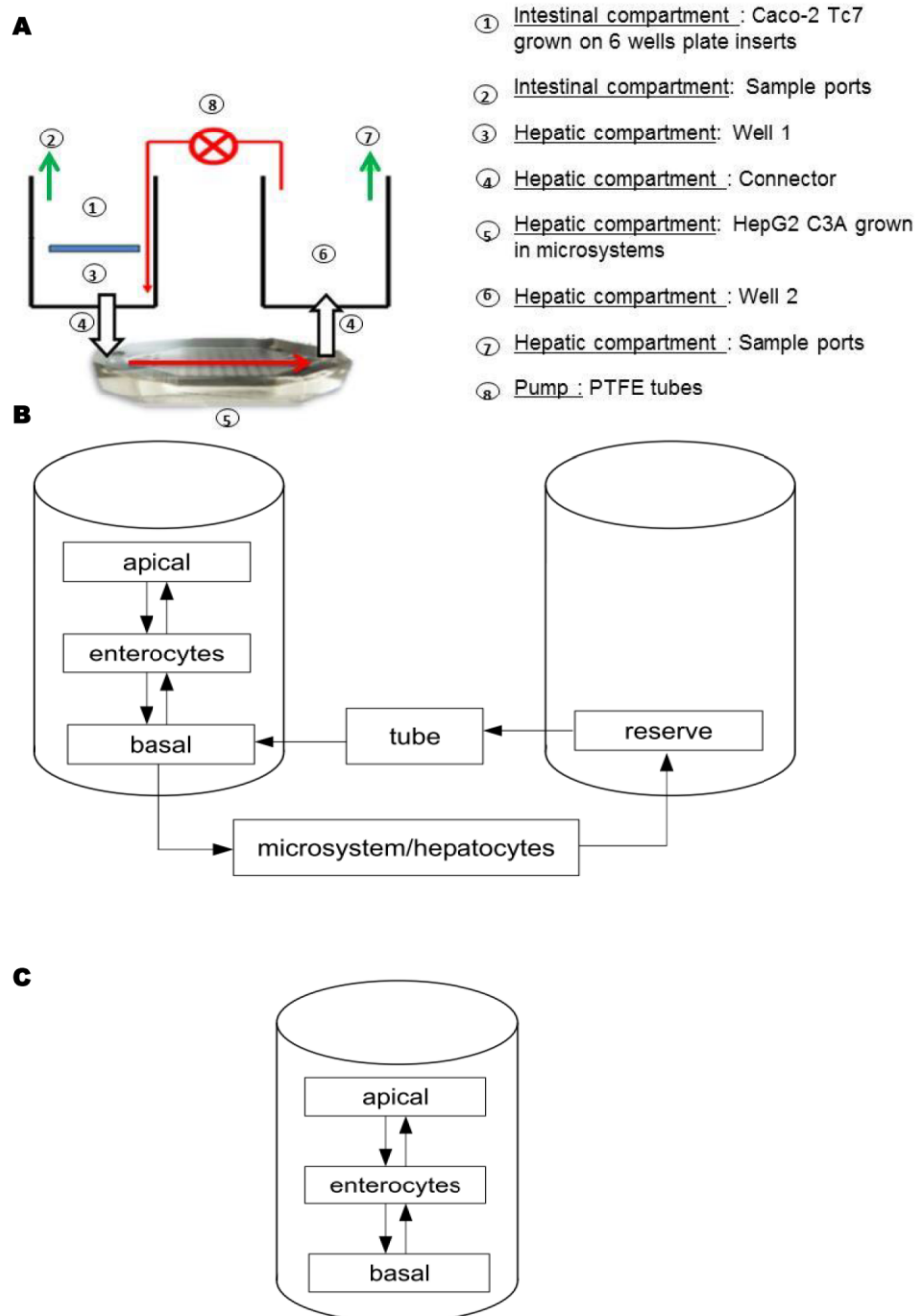


Figure 1: Design of an IIDMP subunit (A) (Bricks et al., 2014b) and PK model used to model the IIDMP (B) and Caco-2 TC7 (C) working.

For each experiment, two IIDMP devices were used, which increased the number of inserts and microsystems used for further analysis at a total of 6 by experiments.

2.4 Experimental procedure of the intestinal and hepatic coculture in the IIDMP

Each experiment took place during three days. On day 0 of the experiment, microchips were prepared by deposition of extracellular matrix at the surface of the microchannels. Collagen diluted in PBS was introduced in the microchips fixed at the device and the IIDMP was placed in an incubator (37°C, 5% CO₂) during 1h. Then, the collagen was washed with seeding medium. Human primary hepatocytes were seeded in the microchips at a density of 125 000 cells/cm². The device was placed overnight at 37°C and with a 5% CO₂ atmosphere. This step corresponds to the adhesion period of hepatocytes.

Following this step and at day 1 of the experiment (D1), the seeding medium was replaced by culture medium. Caco-2 TC7 previously grown and differentiated for 21 days on inserts were placed in the well 1 of the device. To characterize the function and viability of the intestinal cells before perfusion and/or exposure to xenobiotics, tests were performed on intestinal controls (monoculture of Caco-2 TC7). Then, the xenobiotics solution was loaded; the lid of the device was screwed, connected to the peristaltic pump through the tubes and the perfusion launched during 24h at a speed of 25µl/min. In the context of a kinetic, samples were performed both in the intestinal and hepatic compartment using specific ports on the cover of the device. Thanks to this method, it is not necessary to open the cover of the device to take samples of culture medium.

On day 2 of the experiment, the pump was stopped and the cover removed. The Caco-2 TC7 and the primary hepatocytes placed in inserts and in microsystems were detached from the device to perform all tests of viability and functionality required. Similarly, these tests were also performed on the controls (monolayer of Caco-2 TC7).

Once the experiment finished, the devices and these components were cleaned with MilliQ water and autoclaved. Cleaning procedures of the microsystems have been described previously (Bricks et al., 2014b).

2.5 Monoculture of Caco-2 TC7 in inserts and of hepatocytes in the IDCCM device

A classical control consisting of Caco-2 TC7 monoculture was also performed. Conditions of maintenance culture, seeding and culture of these cells in inserts have been described previously. At day 1 of the experiments the maintenance culture medium was removed and replaced by the same medium than used in the IIDMP device (HBM Medium TM with HCM TM KitTM SingleQuots).

Another control consists in the dynamic monoculture of hepatocytes in microsystems with a device called IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems). The design and use of this device was previously described (Baudoin et al., 2012; Legendre et al., 2013) and the results obtained with this device came from a previous article (Bricks et al., 2014a). To investigate eventual interactions between the intestinal and hepatic cells, results obtained after coculture in the IIDMP device were compared with results obtained previously using the IDCCM device and the results obtained using monoculture of Caco-2 TC7 (Figure 2: C; Figure 5).

2.6 Integrity and functionality of the intestinal barrier and of the liver cells

2.6.1 Transepithelial electrical resistance (TEER)

The measurement of the transepithelial resistance is proportional to the state of the tight junctions. This resistance was measured using an Endohm (24SNAP-Chamber) adapted to the use of inserts 6 well format. The final value of transepithelial resistance (TEER expressed in $\Omega \cdot \text{cm}^2$) was calculated using the following equation:

$$TEER = (R_m - R_b)A$$

- R_m is the resistance (Ω) obtained after using the Endohm.
- R_b is the resistance (Ω) of the inserts without culture of Caco-2 TC7.

- A is the surface area (cm²) of the inserts on which Caco-2 TC7 were grown.

2.6.2 Viability and activity of liver cells

Before inoculation and at the end of each experiment, the number of cells was counted on Malassez cell. In the same time, trypan blue staining was performed to estimate the number of hepatic live and dead cells.

Albumin synthesis was investigated by an ELISA Sandwich technique (anti Human Albumin IgG coupled with peroxydase) following previous described protocol (Baudoin et al., 2012).

2.6.3 Xenobiotic metabolizing activity of intestinal and hepatic cells

2.6.3.1 Phenacetin and omeprazole metabolism

Phenacetin is a molecule metabolized in paracetamol by the CYP1A2 of cells and omeprazole in omeprazole sulfone by the CYP3A4 and 5 hydroxy omeprazole by the CYP2C19 (Tassaneeyakul et al., 2000). To measure its metabolism, phenacetin (Sigma) was diluted in culture medium at a final concentration of 100 µM and omeprazole (Art molecule) at a final concentration of 60 µM. These molecules were exposed both in dynamic coculture conditions (IIDMP) and static monoculture of Caco-2 TC7.

The quantity of phenacetin and omeprazole metabolites were estimated by the metabolite ratio (MR) calculated using the following equation:

$$MR(\%) = \frac{\text{Quantity of metabolites (nmoles)}}{\text{Quantity of initial substrate (nmoles)}} \times 100$$

2.6.3.2 Adsorption of the substrates and metabolites by the IDCCM and Petri dishes

Adsorption of phenacetin, paracetamol, omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone were tested using the IIDMP device and inserts commonly used to grown the Caco-2 TC7. The conditions of culture were the same as described previously but no cells were placed in the device. The ratio of the quantity of molecules adsorbed was calculated between 1h and 24h of exposure.

2.6.3.3 Mass spectrometry analysis

Protocol used to investigate phenacetin and omeprazole disappearance as well as the APAP, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone appearance in the different conditions of culture was described previously in detail (Bricks et al., 2014a).

2.6.4 Statistical analysis

At least 2 biochips by experiments were used for a total of 3 independent experiments ($n = 3 \times 2$) for each condition. Results were expressed as mean \pm standard deviations (SD). Statistical analysis was performed by one way ANOVA for multiple comparisons. Student t test was used for the comparison using GraphPad software (Prism 6). The used p-values are reported in the figures.

2.7 Mathematical modeling

2.7.1 Pharmacokinetic model

To extract the intrinsic *in vitro* clearances, a pharmacokinetic model was used. The IIDMP platform was described by a six compartment model (Figure 1: B) whereas the Caco-2 TC7 monoculture was described by a three compartment model (Figure 1: C). Equations for distribution and for metabolism in Caco-2 TC7 cells are the same in IIDMP and Caco-2 TC7 monoculture model. Adsorption and desorption of the compound to the Petri walls, the IIDMP walls and perfusion tubes were taken into account *via* the adsorption experiments (*nb*: adsorption experiments were performed without cells). To simplify the set of equations, the compounds bindings to the serum and albumin proteins were taken into account using the adsorptions experiments with BSA. This led to set the “unbound fraction fu_{med} ” parameter to 1 as far as the specific binding of the compounds to the proteins were taken into account

in the adsorption kinetics. A first order relationship rate was assumed for both, hepatic and intestinal metabolisms, because we expected a linear metabolism at the doses used in our experiments. The perfusion was recirculating in the IIDMP and biochips. These assumptions led to the derivation of a set of first order differential equations to model the IIDMP functioning:

$$\frac{dQ_{R1a}(t)}{dt} = CLc \times (C_{caco}(t) - C_{R1a}(t)) - F_b C_{R1a}(t) + k_u Q_{ADS(R1a)}(t) \quad (\text{Eq.1})$$

$$\frac{dQ_{caco}(t)}{dt} = CLc \times (C_{R1a}(t) + C_{R1b}(t) - 2 \times C_{caco}(t)) - fu_{med} \sum CL_{caco,int,invitro,MET=i} C_{caco}(t) \quad (\text{Eq.2})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{R1b}(t)}{dt} = & CLc \times (C_{caco}(t) - C_{R1b}(t)) + F \times (C_{Tb}(t) - C_{R1b}(t)) \\ & - F_b C_{R1b}(t) + k_u Q_{ADS(R1b)}(t) - \frac{dQ_{lost}(t)}{dt} \end{aligned} \quad (\text{Eq.3})$$

$$\frac{dQ_{HepB}(t)}{dt} = F \times (C_{R1b}(t) - C_{HepB}(t)) - fu_{med} \sum CL_{liver,int,invitro,MET=i} C_{HepB}(t) \quad (\text{Eq.4})$$

$$\frac{dQ_{R2}(t)}{dt} = CLc \times (C_{HepB}(t) - C_{R2}(t)) - F_b C_{R2}(t) + k_u Q_{ADS(R2)}(t) \quad (\text{Eq.5})$$

$$\frac{dQ_{Tb}(t)}{dt} = F \times (C_{R2}(t) - C_{Tb}(t)) - F_b C_{Tb}(t) + k_u Q_{ADS(Tb)}(t) \quad (\text{Eq.6})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{ADS}(t)}{dt} = & F_b \times (C_{R1a}(t) + C_{R1b}(t) + C_{R2}(t) + C_{Tb}(t)) \\ & - k_u \times (Q_{ADS(R1a)}(t) + Q_{ADS(R1b)}(t) + Q_{ADS(R2)}(t) + Q_{ADS(Tb)}(t)) \end{aligned} \quad (\text{Eq.7})$$

In which:

- CLc is the rate constant for diffusion through Caco-2 TC7 cells ($\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). CLc is linked to the rate of the molecules equilibration on both sides of the Caco-2 TC7 barrier,
- The subscripts $R1a$, $R1b$, $R2$, $HepB$, Tb correspond respectively to the two reservoirs (with apical and basal for R1 and reserve for R2), the hepatic biochip and the tubing compartments (Figure 1: B),
- F is the flow rate in the recirculating perfusion system ($25 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$),
- C_i is the concentration in the compartment i ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),
- Q_i is the amount in the compartment i (μmol),
- C_i and Q_i are linked by the volume V_i as follow $C_i = Q_i/V_i$,
- $CL_{int,invitro}$ is the *in vitro* intrinsic clearance (estimated by the model) ($\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$),

- fu_{med} is the unbound fraction in the culture medium, it is set to 1,
- $Q_{ADS(R1a)}$, $Q_{ADS(R1b)}$, $Q_{ADS(R2)}$ and $Q_{ADS(Tb)}$ are the quantity of molecules adsorbed in the tubing circuit (μmol),
- F_b (in $\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$) and k_u (s^{-1}) are the adsorption/desorption rates for non-specific binding on the walls (tubes, reservoirs, biochips) to be estimated by the model,
- $\frac{dQ_{lost}(t)}{dt}$ is the equation modeling the inclusion of samples and secondary metabolism.

The kinetics of the metabolites were described with a similar model. For one metabolite (subscript *Met*), the model is:

$$\frac{dQ_{R1,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{T,Met}(t) - C_{R1,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R1,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(R1,Met)}(t) \quad (\text{Eq.8})$$

$$\frac{dQ_{caco,Met}(t)}{dt} = CL_{C_{Met}} \times (C_{R1a,Met}(t) + C_{R1b,Met}(t) - 2 \times C_{caco,Met}(t)) + fu_{med} CL_{caco,int,invitro,Met} C_{caco,Met}(t) \quad (\text{Eq.9})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{R1b,Met}(t)}{dt} = & CL_{C_{Met}} \times (C_{caco,Met}(t) - C_{R1b,Met}(t)) + F \times (C_{Tb,Met}(t) - C_{R1b,Met}(t)) \\ & - F_{b,Met} C_{R1b,Met}(t) + k_u Q_{ADS(R1b,Met)}(t) - \frac{dQ_{lost,Met}(t)}{dt} \end{aligned} \quad (\text{Eq.10})$$

$$\frac{dQ_{HepB,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R1b,Met}(t) - C_{HepB,Met}(t)) + fu_{med,Met} CL_{liver,int,invitro,Met} \times C_{HepB,Met}(t) \quad (\text{Eq.11})$$

$$\frac{dQ_{R2,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{HepB,Met}(t) - C_{R2,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{R2,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(R2,Met)}(t) \quad (\text{Eq.12})$$

$$\frac{dQ_{Tb,Met}(t)}{dt} = F \times (C_{R2,Met}(t) - C_{Tb,Met}(t)) - F_{b,Met} C_{Tb,Met}(t) + k_{u,Met} Q_{ADS(Tb,Met)}(t) \quad (\text{Eq.13})$$

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{ADS,Met}(t)}{dt} = & F_{b,Met} \times (C_{R1a,Met}(t) + C_{R1b,Met}(t) + C_{R2,Met}(t) + C_{Tb,Met}(t)) \\ & - k_{u,Met} \times (Q_{ADS(R1a,Met)}(t) + Q_{ADS(R1b,Met)}(t) + Q_{ADS(R2,Met)}(t) + Q_{ADS(Tb,Met)}(t)) \end{aligned} \quad (\text{Eq.14})$$

2.7.2 Parameter estimations and statistical methods

Metabolite formations and parent drug clearances were linked by the terms $CL_x C_x$ in equations 2, 4, 9 and 11. The equations were calculated and solved using the quantities in micromole to respect the stoichiometry. Adsorption rates (F_b , k_u) and clearances (CL_x) for parent compounds and metabolites were estimated and optimized using experimental results. The parameters were estimated using prior

distributions in a Bayesian inference framework (Bois, 2009; Hamon et al., 2013). The data likelihoods were assumed to follow lognormal distribution centered on the model predictions. The prior parameter distributions chosen were vague. Markov chain Monte Carlo simulations were performed using *GNU MCSIM* v5.4.0 (Bois, 2009). The convergence of the posterior solution was checked by the Gelman and Rubin criterion (Gelman and Rubin, 1992) on the last 100,000 iterations of three simulated Markov chains (each of 200,000 iterations in total).

2.7.3 Calculation of the hepatic *in vivo* clearances and of the hepatic availability of the phenacetin and omeprazole

In vitro intrinsic clearances estimated from the *in vitro* experiments were scaled to correspond to *in vivo* intrinsic clearances. For that purpose, a scaling factor (*SF1*) was applied to express the *in vitro* intrinsic clearances in ml/min/kg of body mass. Hepatocellularity was set to 99×10^6 hepatocytes per gram of liver (Barter et al., 2007) and liver weight to 25 grams per kilogram of body mass in the case of humans (Zuegge et al., 2001). Multiplication of these two quantities defines the scaling factor (*SF*) equal to 2475×10^6 hepatocytes per kilogram of body mass for *in vitro/in vivo* extrapolation of the intrinsic clearance.

$$CL_{int, in vivo} = CL_{liver, int, in vitro} SF1 \quad (\text{Eq. 15})$$

Extrapolation of hepatic intrinsic clearance to *in vivo* clearance is usually performed *via* models with a different degree of complexity that describes blood dispersion within the liver (Pang and Rowland, 1977a, 1977b). The three typical models (well-stirred, parallel tube and dispersion models) have been shown to exhibit minor differences for a wide range of drugs (Ito and Houston, 2004). Nevertheless, the well-stirred models were used in this study. The hepatic clearance is given as:

$$CLh_w = \frac{Q_H \times \frac{fu_b}{fu_{med}} \times CL_{int, in vitro} \times SF1}{Q_H + \frac{fu_b}{fu_{med}} \times CL_{int, in vitro} \times SF1} \quad (\text{Eq.16})$$

In which the liver blood flow, Q_H , was set to 20 ml/min/kg of human bodyweight (McGinnity et al., 2004). As the adsorption experiments and the clearance experiments were performed with BSA, the unbound fraction of the drug in blood (fu_b)

was set to 1 (as for the fu_{med}). Intrinsic clearances estimated from the pharmacokinetic models were then used to derive hepatic clearances.

Then, hepatic availability is given by the following equation (Prot et al., 2014) and is the relative quantity of phenacetin and omeprazole escaping liver metabolism:

$$Fh = 1 - \frac{CLh_{in vivo}}{Q_H} \quad (\text{Eq. 17})$$

In which $CLh_{in vivo}$ is the hepatic clearance and Qh is the liver blood flow described previously in the equation 16.

2.7.4 Calculation of the intestinal availability of the phenacetin and omeprazole

The intestinal *in vitro* intrinsic clearances obtained from the model were also scaled into intestinal *in vivo* intrinsic clearances using a scaling factor $SF2$. This scaling factor is based on the mass of intestine per kilogram of body mass (7, 5 g per kg of body mass following results of Lin et al., 1999) and the number of enterocytes per gram of intestine (estimated to 250×10^6 enterocytes per 0.685 g of intestine, (Prot et al., 2014)).

$$CL_{gut, int, in vivo} = CL_{gut, int, in vitro} SF2 \quad (\text{Eq. 18})$$

To calculate intestinal availability of phenacetin and omeprazole, two equations proposed previously by (Prot et al., 2014) were used. Firstly, Q_{gut} , a parameter combining the enterocytic blood flow (Q_{ent}) fixed at 18 L/h and the permeability of the enterocytes to the drug (CLc) (Gertz et al., 2010) obtained from the model and scaled with $SF2$, was calculated.

$$Q_{gut} = \frac{CLc \times SF2 \times Q_{ent}}{Q_{ent} + CLc \times SF2} \quad (\text{Eq. 19})$$

Then, the intestinal availability corresponding to the relative quantity of phenacetin and omeprazole absorbed and escaping the intestinal first pass metabolism was calculated:

$$Fg = \frac{Q_{gut}}{Q_{gut} + fu_{gut} \times CL_{gut, int, in vivo}} \quad (\text{Eq. 20})$$

Where, f_{ugut} represents the fraction of unbound molecules in the intestinal compartment and was set at 1 (Prot et al., 2014).

2.7.4 Calculation of the global availability of the phenacetin and omeprazole

Once intestinal (F_g) and hepatic availabilities (F_h) were determined, the oral availability of the two drugs was calculated as following:

$$F_{oral} = F_{abs} \times F_g \times F_h \quad (\text{Eq.21})$$

Where F_{abs} is the fraction of the molecules absorbed from the intestinal tract. For omeprazole and phenacetin, F_{abs} was set at 1 and 0.91 based on the value reported by Paixão et al (Paixão et al., 2012).

3. RESULTS

3.1 Functionality and viability of the hepatic cells and Caco-2 TC7

270 389 \pm 3 233 hepatocytes (Figure 2: A) were initially introduced (D0) in the IIDMP with a viability of 66.83 \pm 2.05% (Figure 2: B). After 24h of dynamic coculture (D2), the number of hepatocytes measured was 173 778 \pm 19 603 (Figure 2: A) and the viability was 73.70 \pm 3.32% (Figure 2: B). Hepatocytes produced 1191 \pm 230 ng of albumin/ 10^6 cells/h and 990 \pm 273 ng of albumin / 10^6 cells/h after 24 h of culture in the IIDMP and in the IDCCM devices (Bricks et al., 2014a) respectively (Figure 2: C). No significant differences were observed between these two conditions of culture.

Transepitheliale electric resistance (TEER) was significantly lower when the Caco-2 TC7 were cultivated during 24h in the IIDMP compared to the result obtained after 24h of static monoculture (Figure 2: D). The values obtained were 241.10 \pm 28.89 Ω .cm² in static conditions and 148.4 \pm 22 Ω .cm² in dynamic conditions of coculture (IIDMP).

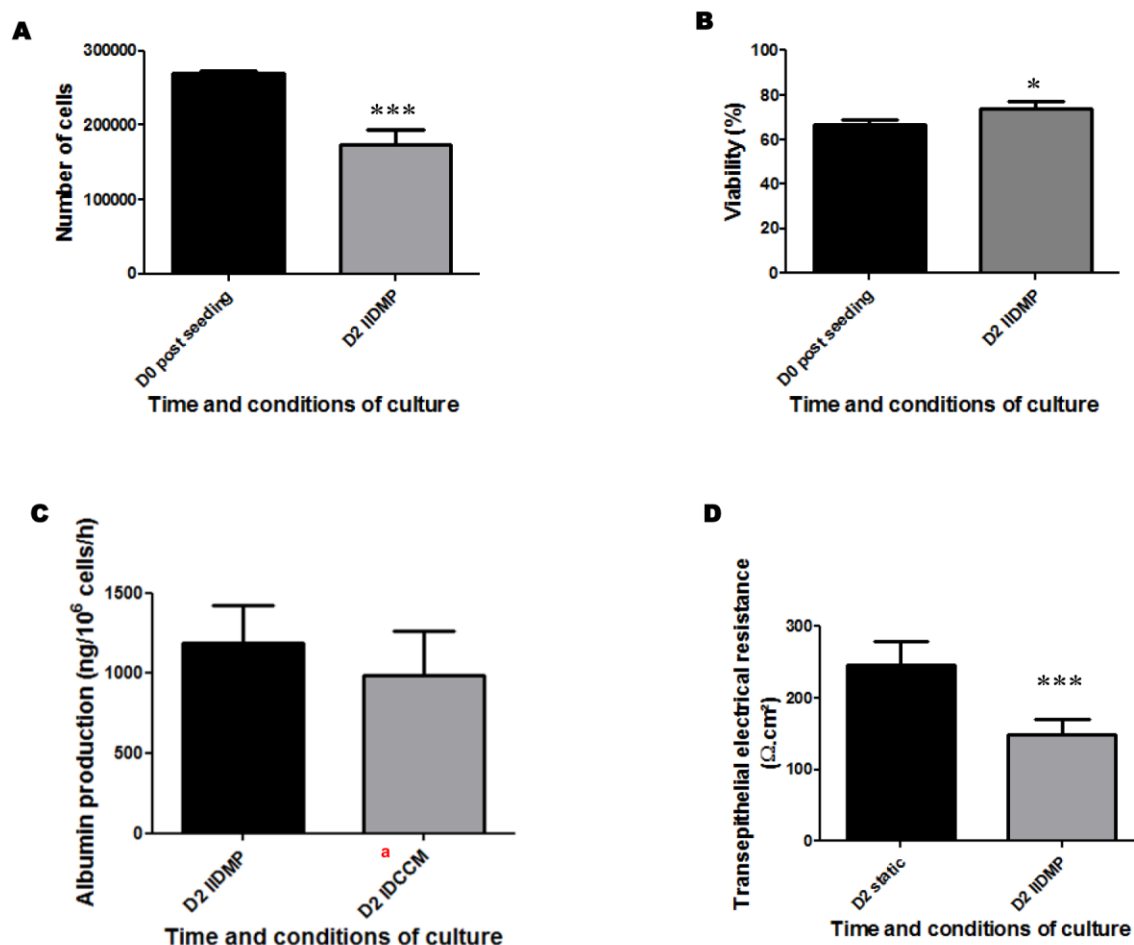


Figure 2: Evolution of the hepatocytes number (A), viability (B), albumin production (C) and of the Caco-2 TC7 transepithelial resistance (D). The viability and hepatocytes number obtained before the cells adhesion were compared with the results obtained after one day of coculture in the IIDMP (A and B). The albumin productions obtained after 24h of intestinal and hepatic coculture (in the IIDMP) and after the monoculture of hepatocytes in microsystems (^a Bricks et al., 2014a) were compared (C). The transepithelial resistance obtained after one day of static culture of the Caco-2 TC7 and one day of coculture in the IIDMP device were compared (D). Number of cells was evaluated using Malassez cells and viability by Trypan blue test. Results were compared using t-test. At least three independent experiments were performed. * and *** indicate a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$ and $p_{\text{value}} < 0.005$).

3.2 Evolution of the phenacetin and omeprazole concentrations

Adsorption of omeprazole and phenacetin (Figure 3: A) by the IIDMP device were significantly higher than the adsorption by the inserts. $61.16 \pm 0.30\%$ of omeprazole and $50.39 \pm 5.31\%$ of phenacetin were adsorbed by the IIDMP device versus $27.04 \pm 0.57\%$ of omeprazole and $37.60 \pm 1.99\%$ of phenacetin by the inserts of culture. Adsorption of the omeprazole and phenacetin metabolites (Figure 3: B)

was not significantly different except for the omeprazole sulfone. $2.90 \pm 0.15\%$ of paracetamol, $3.77 \pm 0.83\%$ of 5 OH omeprazole and $7.93 \pm 16.37\%$ of omeprazole sulfone were adsorbed by the IIDMP device. $3.18 \pm 0.28\%$ of paracetamol, $4.16 \pm 1.19\%$ of 5 OH omeprazole and $2.63 \pm 6.55\%$ of omeprazole sulfone were adsorbed by the inserts.

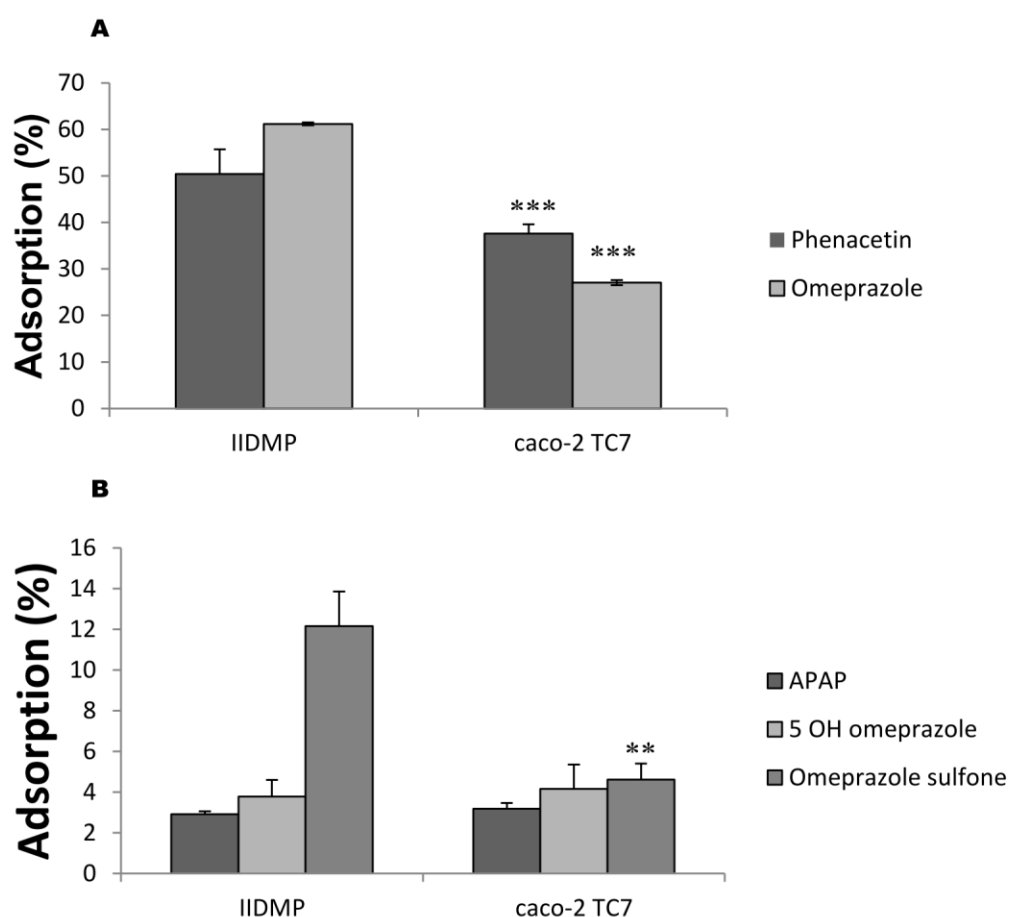


Figure 3: Adsorption ratios (% of the initial quantity of substrates) of phenacetin, omeprazole (A) and APAP, 5 OH omeprazole, omeprazole sulfone (B) after 24h of exposition in the IIDMP device and in inserts. No cells were grown in the two configurations of culture to test the adsorption. Results obtained in the IIDMP and inserts configuration of culture were compared using a one way ANOVA test. At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_value > 0.05$). ** and *** indicate a significant difference ($p_value < 0.01$ and $p_value < 0.005$).

Phenacetin (Figure 4: A) and omeprazole (Figure 4: B) apical concentrations tended to equalize with basal concentrations after 5h of exposition. Omeprazole and phenacetin concentrations were significantly lower in the IIDMP than in the Caco-2 TC7 monoculture from 1h of exposure.

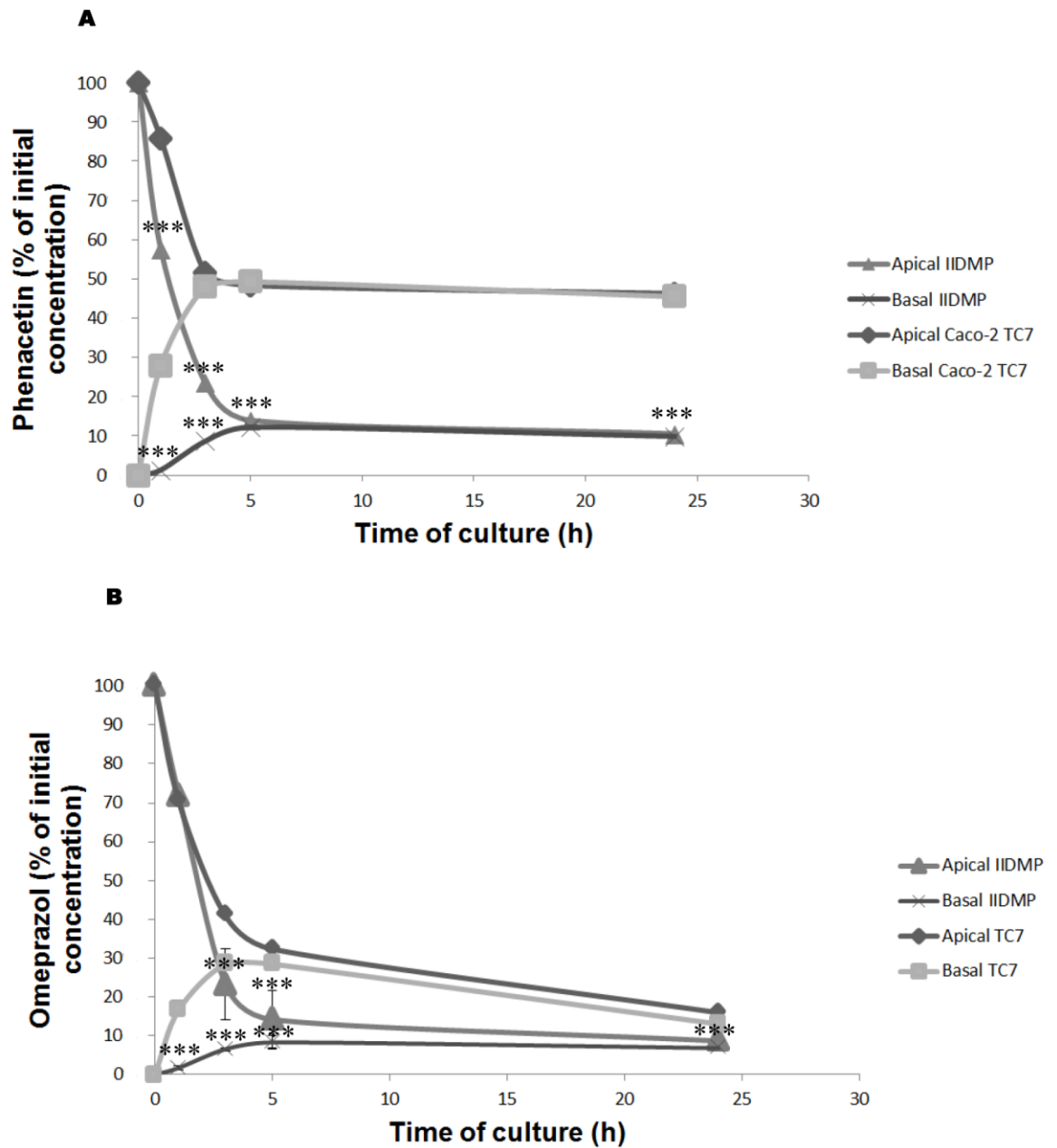


Figure 4: Evolution of the ratio of phenacetin and omeprazole concentration during 24h of exposition in the IIDMP device and in the monoculture of Caco-2 TC7. Results were compared between these two conditions of culture using one way ANOVA. **** indicates a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.001$). At least three independent experiments were performed.

3.3 Metabolism of the phenacetin and omeprazole

Appearance of 5 OH omeprazole (Figure 5: A), omeprazole sulfone (Figure 5: B) and APAP (Figure 5: C) were investigated in two configurations of culture: after monoculture of Caco-2 TC7 and dynamic coculture of Caco-2 TC7 and hepatocytes in the IIDMP. Moreover, results obtained in these two configurations of culture were compared with those obtained previously when hepatocytes were grown in another microfluidic device called IDCCM (Integrated Dynamic Cell Culture in Microsystems). These results were added to the results obtained after monoculture of the Caco-2 TC7 (IDCCM + TC7) in the goal to investigate intestinal and hepatic potential interactions following the coculture in the IIDMP. Productions of 5OH omeprazole and omeprazole sulfone were similar after coculture in the IIDMP and after hepatocytes monoculture in the IDCCM added to the results obtained after monoculture of Caco-2 TC7 (IDCCM + TC7). At the opposite, production of APAP was significantly higher at 3h and 24h of exposure in the IIDMP than in the IDCCM and TC7 configurations of culture. It was found respectively APAP metabolite ratios of $1.1 \pm 0.1 \%$ and $0.30 \pm 0.1 \%$ at 3h and $2.25 \pm 0.25 \%$ and $1.62 \pm 0.16 \%$ at 24h for the IIDMP and IDCCM + TC7 conditions of culture.

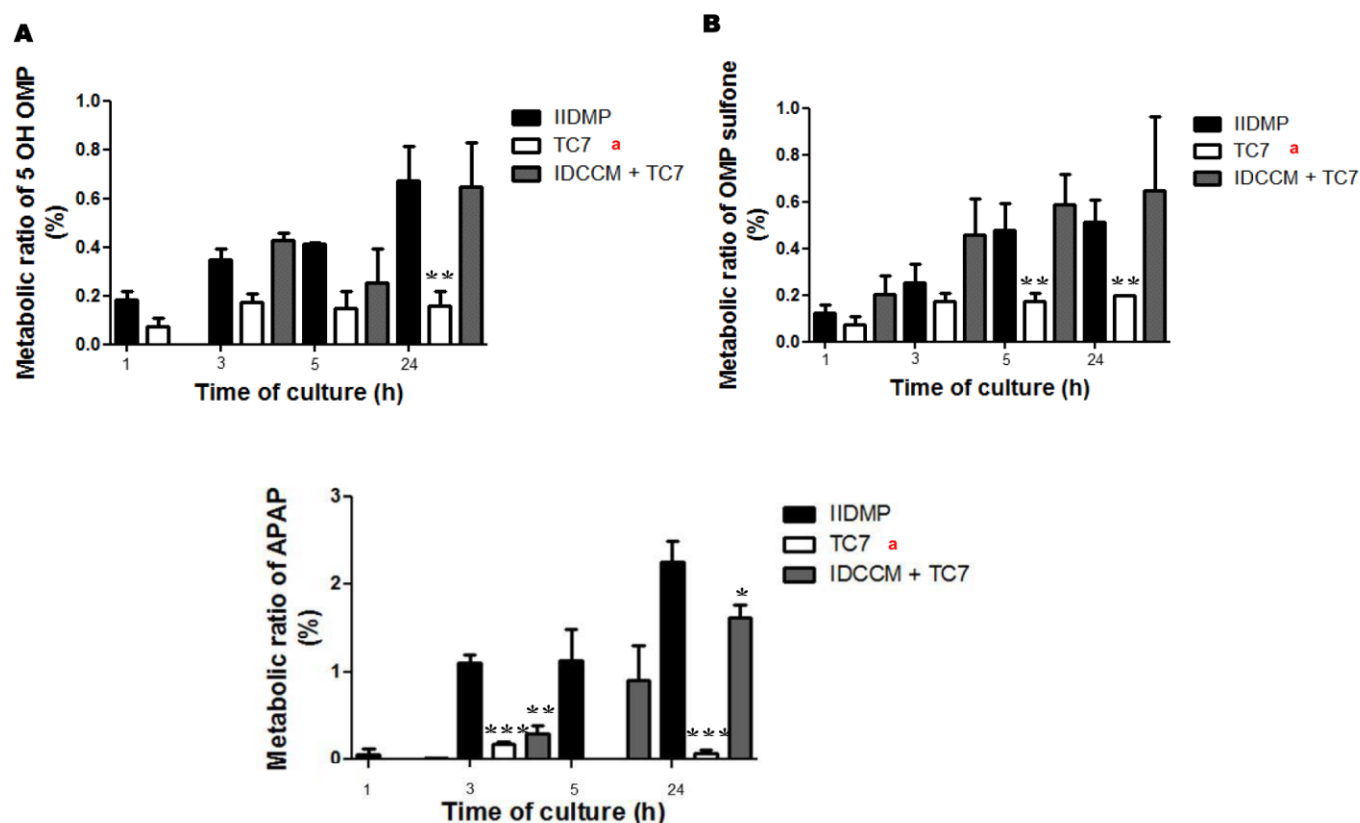


Figure 5: Metabolic ratio (%) of 5 OH omeprazole (A), omeprazole sulfone (B) and APAP (C) during 24h of hepatocytes and Caco-2 TC7 coculture in the IIDMP device, hepatocytes monoculture in the IDCCM device and Caco-2 TC7 monoculture. The metabolic ratios following an exposition of the hepatocytes grown in the IDCCM device were reported from a previous article (^a Bricks et al., 2014a) and were added with the results obtained after the Caco-2 TC7 monoculture. Results were compared using one way ANOVA. At least three independent experiments were performed. ns indicates non significant differences ($p_{\text{value}} > 0.05$). *, ** and *** indicate a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$, $p_{\text{value}} < 0, 01$ and $p_{\text{value}} < 0.005$).

3.4 Prediction of intrinsic intestinal clearances, permeability clearances and intestinal availability of the phenacetin and omeprazole

In order to check the reliability of the PK model, the experimental and modeled data after omeprazole (Figure 6) and phenacetin (Figure 7) exposition of the hepatocytes and Caco-2 TC7 cultivated in the IIDMP were compared. The experimental data seem effectively approximated by the estimation produced by the PK model.

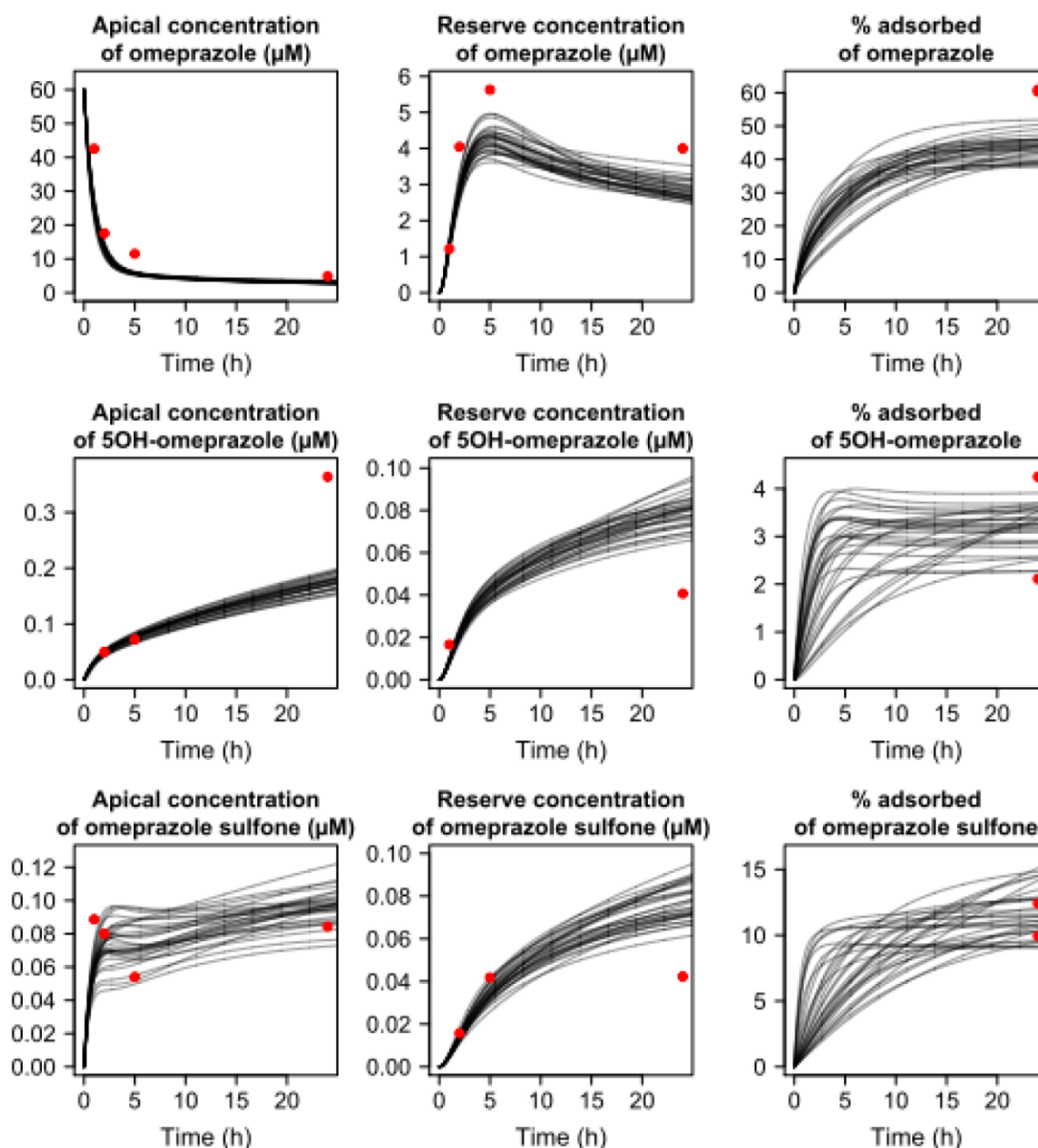


Figure 6: Estimated and experimental concentrations of omeprazole, 5 OH omeprazole and omeprazole sulfone in the different compartments of the IIDMP device. The concentrations were measured and estimated during 24h of exposition. 60 μM of omeprazole were initially introduced. The black lines represent prediction of the PK model using 30 vectors chosen randomly and a posteriori whereas the red rings represent experimental data.

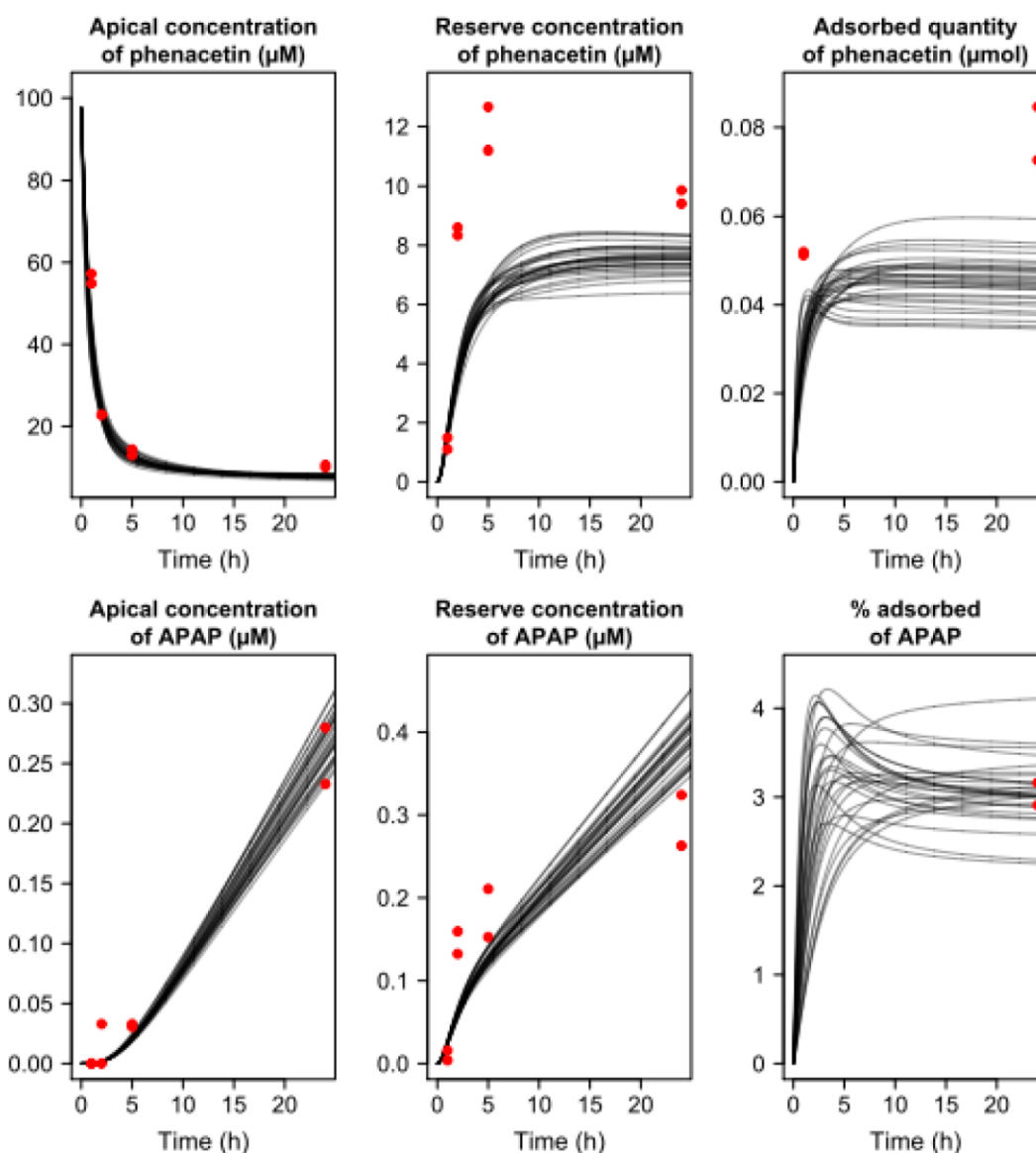


Figure 7: Estimated and experimental concentrations of phenacetin and paracetamol in the different compartments of the IIDMP device. The concentrations were measured and estimated during 24h of exposition. 100 μM of phenacetin were initially introduced. The black lines represent prediction of the PK model using 30 vectors chosen randomly and a posteriori whereas the red rings represent experimental data.

Intrinsic clearances ($CL_{int, in vitro}$) linked to the metabolism of omeprazole and phenacetin by the Caco-2 TC7 grown in the IIDMP device and cultivated in Petri were calculated using the PK model (Table 1). We found respectively intestinal intrinsic *in vitro* clearances of 0.54 ± 0.13 and 0.19 ± 0.28 $\mu\text{l}/\text{min}/10^6$ cells for the omeprazole, $<10^{-3}$ and 0.05 ± 0.01 $\mu\text{l}/\text{min}/10^6$ cells for the phenacetin.

The clearances linked to the Caco-2 TC7 permeability (CL_c) were also compared between IIDMP and Petri conditions of culture with values of 77.40 ± 13.70 and 46.08 ± 15.17 $\mu\text{l}/\text{min}/10^6$ cells for omeprazole, 61.44 ± 15.12 and 54.36 ± 21.74 $\mu\text{l}/\text{min}/10^6$ cells for phenacetin (Table 1).

Then, intestinal availability of omeprazole and phenacetin in the IIDMP were calculated with values of 0.92 and 1 versus 0.97 and 0.99 when Caco-2 TC7 were cultivated in Petri (Table 1).

	CL _{int, in vitro} ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6\text{cells}$)		CL _c ($\mu\text{L}/\text{min}/10^6\text{cells}$)		F _g	
	TC7 IIDMP	TC7	TC7 IIDMP	TC7	TC7 IIDMP	TC7
Omeprazole	0.54 (0.13)	0.19 (0.28)	77.40 (13.70)	46.08 (15.17)	0.92	0.97
X ₁ = Omeprazole sulfone	0.38 (0.12)	0.12 (0.02)	73.92 (77.04)	*		
X ₂ = 5 hydroxy Omeprazole	0.15 (0.03)	0.07 (0.02)	0.10 (0.41)	5.35 x 10 ⁻⁵ (2.76x10 ⁻⁵)		
Phenacetin	<10 ⁻³	0.05 (0.01)	61.44 (15.12)	54.36 (21.74)	1	0.99
X ₁ = Paracetamol	<10 ⁻³	0.05 (0.01)	46.32 (17.112)	*		

Table 1: Estimation of intestinal omeprazole and phenacetin kinetic parameters using the PK model. Experimental data were obtained after the coculture of Caco-2 TC7 in the IIDMP device (TC7 IIDMP) and monoculture of Caco-2 TC7 in Petri (TC7). CL_{int, in vitro} and CL_c are the *in vitro* intrinsic clearance and permeability clearance from the PK model. F_g is the intestinal availability corresponding to the relative quantity of drugs absorbed and escaping the intestinal first pass metabolism. * were reported when parameters are not identifiable.

3.5 Prediction of the *in vivo* hepatic clearances and hepatic availability of the phenacetin and omeprazole

Clearances *in vivo* (CL_{h in vivo}) obtained in the hepatic compartment of the IIDMP and after the monoculture of hepatocytes in microsystems and in Petri dishes were calculated using the well stirred model (Table 2). The values were respectively 1.46 ± 0.25 , 1.44 ± 0.32 and 1.07 ± 0.30 ml/min/kg of BDW for omeprazole and 3.10 ± 0.36 , 0.57 ± 0.13 and 2.68 ± 0.39 ml/min/kg of BDW for phenacetin.

Hepatic availability (CLh *in vivo*) of omeprazole was 0.93, 0.93 and 0.95 in the IIDMP, IDCCM and Petri conditions of culture respectively and 0.84, 0.97 and 0.87 for the phenacetin in these three conditions (Table 2).

	CLh <i>in vivo</i> (well stirred) (ml/min/kg of BDW)					Fh				
	IIDMP	IDCCM	Petri	Predicted (literature)	Observed (literature)	IIDMP	IDCCM	Petri	Predicted (literature)	Observed (literature)
Omeprazole	1.46 (0.25)	1.44 (0.32)	1.07 (0.31)	3.7 ²	5.8 ¹ 7.5 ²	0.93	0.93	0.95	0.84 ¹	0.71 ¹
X1 = Omeprazole sulfone	0.16 (0.19)	0.72 (0.17)	0.36 (0.18)							
X2 = 5 hydroxy Omeprazole	1.32 (0.17)	0.78 (0.21)	0.74 (0.25)							
Phenacetin	3.10 (0.36)	0.57 (0.13)	2.68 (0.39)	20.8 ³	11.9 ¹ 19.6 ³	0.84	0.97	0.87	0.55 ¹	0.41 ¹
X1 = Paracetamol	3.10 (0.36)	0.57 (0.13)	2.68 (0.39)							

Table 2: Estimation of hepatic omeprazole and phenacetin kinetic parameters using the PK model. Experimental data were obtained after the coculture of human primary hepatocytes in the IIDMP device, monoculture of hepatocytes in microfluidic conditions (IDCCM) and in Petri. CLh, *in vivo* is the hepatic *in vivo* clearance obtained from the PK model and using the well stirred method of calculation. Fh is the hepatic availability corresponding to the relative quantity of drugs escaping the hepatic first pass metabolism. The literature data were obtained from: ¹(Paixão et al., 2012), ²(McGinnity et al., 2004) and ³(Shibata et al., 2002) using hepatocytes in suspension.

3.6 Prediction of the oral bioavailabilities of phenacetin and omeprazole

The oral bioavailabilities of phenacetin and omeprazole were lower after coculture in the IIDMP with values of 0.77 and 0.85 versus 0.88 and 0.90 using data obtained separately from the IDCCM and Caco-2 TC7 monoculture and 0.92 and 0.78 using data obtained from the Petri and Caco-2 TC7 monoculture (Table 3).

F _{oral}	IIDMP	Petri + TC7	IDCCM + TC7	Literature data observed	Literature data predicted
Omeprazole	0.85	0.92	0.90	0.71 ¹	0.84 ¹
Phenacetin	0.77	0.78	0.88	0.37 ¹	0.54 ¹

Table 3: Prediction of omeprazole and phenacetin oral bioavailabilities using *in vitro* and literature data. F_{oral} is the oral human bioavailability. Literature values¹ (Paixão et al., 2012) were obtained using hepatocytes suspension and Caco-2 monoculture for the predicted data.

4. DISCUSSION

4.1 Drugs absorptions and bioavailabilities of the omeprazole and phenacetin in the IIDMP device

Intestinal first pass metabolism may extensively reduce the bioavailability of drugs even if this role is often underestimated in comparison with hepatic first pass effect. Indeed, the classical *in vitro* studies consist routinely in the drugs exposition of liver microsomes, hepatocytes cultivated in suspension and in monolayer in Petri dishes (Gavhane and Yadav, 2012; Zhang et al., 2012). Moreover, *in vitro* and *in vivo* oral bioavailabilities extrapolations are calculated using separate *in vitro* data obtained from cultures of Caco-2 (mainly permeability data) and of hepatocytes (metabolism data) (Lau et al., 2004; Paixão et al., 2012). In this article, another *in vitro* system of culture was tested, integrating in the same device an intestinal barrier (monolayer of Caco-2 TC7) and the culture of human primary hepatocytes in microfluidic biochips. Then, in addition to the intestinal permeability and metabolism, the hepatic metabolism data obtained in order to calculate clearances and bioavailabilities were integrated in the PK model.

When the apical side of the Caco-2 TC7 placed in the IIDMP and in Petri was exposed to omeprazole and phenacetin, the decrease of the two concentrations of these substrates were quick in this side (Figure 4). This quick absorption was confirmed by the literature absorption data (Paixão et al., 2012) (Table 1) and by the high intestinal bioavailability of the omeprazole and phenacetin calculated using the PK model (Table 1). Moreover, the intestinal permeability clearances of omeprazole and phenacetin were largely predominant on the intestinal metabolism (Table 1). To investigate the intestinal first pass effect, it would be interesting to check this bioavailability using other drugs slowly absorbed and/or extensively metabolized by the intestinal barrier (Thummel et al., 1996). Moreover, the intestinal metabolism was certainly low in our device because the use of Caco-2 cells as intestinal barrier. Indeed, these cells produced poor CYP activity (Sun et al., 2008).

Therefore, the oral bioavailability of omeprazole and phenacetin calculated using this device and the PK model (Table 3) was mainly limited by the hepatic metabolism as demonstrated by the hepatic availability lower than the intestinal

availability (Table 1 and 2). In consequence, oral bioavailability found using the IIDMP or obtained using separate monoculture of hepatocytes and Caco-2 TC7 were similar for phenacetin and omeprazole and under predict the literature data observed *in vivo* (Table 3). It could be corrected in part by the introduction of an extrahepatic metabolism in the model. In fact renal/biliary excretion may play an important role in the reduction of the drugs oral bioavailability *in vivo* (Lau et al., 2004).

When calculating the permeability clearance (CL_c) of 5 OH omeprazole, the observed values were largely smaller than the other permeability clearances (omeprazole sulfone and omeprazole) after coculture in the IIDMP and using Caco-2 TC7 in monoculture (Table 1). This is due to the equilibration of this metabolite concentration on both sides of the intestinal barrier. Indeed, experimental measures showed that the concentrations of 5 OH omeprazole were not equilibrated at the end of experiments with higher concentrations of 5 OH omeprazole on the apical side than on the basal side of the intestinal barrier (data not shown). The 5 OH omeprazole seems preferentially excreted on the apical side of the intestinal barrier probably by efflux transporters. This hypothesis could be check with a 5 OH omeprazole exposition of Caco-2 TC7 and activity test of efflux transporter like the Pgp.

4.2 Intestinal and hepatic interactions after 24h of coculture in the IIDMP device

Our previous study demonstrated stimulating effects of the intestinal and hepatic cell lines coculture on the hepatic CYP1A activities and on the albumin production of the hepatic cells (Bricks et al., 2014b). Then, we searched to demonstrate similar coculture effect using a coculture of intestinal cell line and of human primary hepatocytes.

No coculture effects were observed concerning hepatic albumin production and hepatocytes viability (Figure 2: B and C). Then, albumin production by the hepatocytes did not seem affected by the flux of culture medium and the coculture with intestinal cells. This finding is at the opposite of literature reports using hepatic cell lines HepG2 C3A and primary hepatocytes (Mazzei et al., 2010; Bricks et al., 2014b). This difference may be explained by the different conditions of culture used as the flow rate and the origin of the cells. In addition, we measured high albumin

levels closed to *in vivo* levels (*in vivo* value was estimated equal to 1700 ng/h/10⁶ cells based on the data of Barle et al., 1997, versus around 1000 ng/h/10⁶ cells with the IIDMP device and in Petri). This result may also explain the absence of increase after a step of perfusion.

Cells cultivated in the IIDMP device metabolized at a higher level (metabolite ratios) phenacetin in paracetamol than the addition of the metabolism values found after dynamic monoculture of the hepatocytes in the IDCCM device (Bricks et al., 2014a) and monoculture of Caco-2 TC7 (Figure 5: C) (IDCCM + Caco-2 TC7). This increase in the coculture situation using intestinal and hepatic cell lines was showed in a previous study (Bricks et al., 2014b). Moreover, this improvement was highlighted by the hepatic clearance of phenacetin in APAP, better after 24h of exposition in the IIDMP than the clearances measured in the IDCCM or even Petri configurations of culture (Table 2). Then, improvement of the CYP1A2 hepatic activity (compared with monoculture of hepatic cells in the IDCCM), using dynamic coculture of intestinal and hepatic cells in the IIDMP, was confirmed. However this increase in the coculture conditions is not sufficient to lead of difference between oral bioavailability of phenacetin in coculture and Petri conditions of culture (Table 3). This improvement was not observed with the omeprazole metabolism using the metabolite ratios (Figure 5: A and B) and hepatic clearances (Table 2) even if differences were observed considering the omeprazole sulfone and 5 OH omeprazole clearances (Table 2).

Interestingly, when Caco-2 TC7 were cultivated with human primary hepatocytes in the IIDMP, a significant decrease of the transepithelial resistance of the intestinal barrier was detected. This decrease was not observed when the Caco-2 TC7 were cultivated in static Petri dishes (Figure 2: D). Moreover, the clearances associated to the phenacetin and omeprazole permeabilities of the Caco-2 TC7 (CL_c, Table 1) were higher when these cells were cultivated in the IIDMP than in simple and static conditions of culture. However, this effect was not observed when using intestinal and hepatic cell lines and using the same device and conditions of culture (flow rate of 25µl/min) (Bricks et al., 2014b). The flux combined with the coculture of

human primary hepatocytes and Caco-2 TC7 seem produced an enhancement of the Caco-2 TC7 monolayer permeability.

To explain the decrease of the TEER and the increase of the hepatic CYP1A2 in the IIDMP, we hypothesized an interaction effect due to the intestinal and hepatic cells culture in dynamic conditions of culture. This also may be due in part to the IIDMP design and exposure mode. Indeed, the omeprazole and phenacetin which were loaded in the apical side of the intestinal compartment; diffused through the intestinal barrier and then were diluted in the hepatic compartment. As a result, kinetics of the drugs on the cells were not similar to direct exposure. Indeed, in Petri and IDCCM conditions of culture, these two substances were loaded directly in contact with the hepatocytes. To see if this stimulating effect is due to the intestinal and hepatic interactions, it would be necessary to perform coculture of Caco-2 TC7 and human primary hepatocytes in Petri dishes as previously described (Bricks et al., 2014a).

5. CONCLUSION

This study demonstrated the feasibility of a coculture device allowing the integration of the intestinal absorption but also of the intestinal and hepatic metabolism in a single model. However, the use of drugs quickly absorbed by the intestinal barrier has limitations. In consequence, the oral bioavailabilities extrapolated from *in vitro* data were similar in our device when compared to the results obtained using separate data from the monoculture of hepatocytes and Caco-2 TC7. Complementary studies were needed using drugs extensively metabolized and slowly absorbed by the intestinal barrier to validate the calculation method of the oral bioavailability we proposed in comparison with data observed *in vivo*.

Nevertheless, it was showed that the use of Caco-2 TC7 and human primary hepatocytes in the device was linked with a TEER decrease and a higher metabolic activity of the hepatic CYP1A2 than observed after the monoculture of Caco-2 TC7 and hepatocytes. Then, the use of this device seems highlight phenomena of interaction between intestinal and hepatic cells in dynamic culture.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche et l’Innovation” from the “Université de Technologie de Compiègne” (ToxOnChip project). We thank Pr. P. Anton Gay from the Institut Polytechnique LaSalle Beauvais who provided the Caco-2 TC7 used in this study.

REFERENCES

- Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Nielsen, H.M., Sarmiento, B., 2013. Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Curr. Drug Metab.* 14, 4–20.
- Barle, H., Nyberg, B., Essén, P., Andersson, K., McNurlan, M.A., Wernerman, J., Garlick, P.J., 1997. The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. *Hepatol. Baltim. Md* 25, 154–158. doi:10.1002/hep.510250128
- Barter, Z.E., Bayliss, M.K., Beaune, P.H., Boobis, A.R., Carlile, D.J., Edwards, R.J., Brian Houston, J., Lake, B.G., Lipscomb, J.C., Pelkonen, O.R., Tucke, G.T., Rostami-Hodjegan, A., 2007. Scaling Factors for the Extrapolation of In Vivo Metabolic Drug Clearance From In Vitro Data: Reaching a Consensus on Values of Human Micro-somal Protein and Hepatocellularity Per Gram of Liver. *Curr. Drug Metab.* 8, 33–45. doi:10.2174/138920007779315053
- Baudoin, R., Alberto, G., Legendre, A., Paullier, P., Naudot, M., Fleury, M.-J., Jacques, S., Griscom, L., Leclerc, E., 2013a. Investigation of expression and activity levels of primary rat hepatocyte detoxication genes under various flow rates and cell densities in microfluidic biochips. *Biotechnol. Prog.* doi:10.1002/btpr.1857
- Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Legallais, C., Leclerc, E., 2012. Parallelized microfluidic biochips in multi well plate applied to liver tissue engineering. *Sens. Actuators B Chem.* 173, 919–926. doi:10.1016/j.snb.2012.06.050
- Baudoin, R., Prot, J.M., Nicolas, G., Brocheton, J., Brochot, C., Legallais, C., Benech, H., Leclerc, E., 2013b. Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 43, 140–152. doi:10.3109/00498254.2012.706725
- Betton, G.R., 2013. A review of the toxicology and pathology of the gastrointestinal tract. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 321–338. doi:10.1007/s10565-013-9257-y
- Bois, F.Y., 2009. GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models. *Bioinformatics* 25, 1453–1454. doi:10.1093/bioinformatics/btp162
- Bricks, T., Hamon, J., Fleury, M.J., Jellali, R., Merlier, F., Herpe, Y.E., Cotton, J., Bois, F., Leclerc, E., 2014a. Comparison of omeprazole and phenacetin hepatic clearances using human primary cryopreserved hepatocytes in petri and microfluidic cultures. *In review*.
- Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P.M., Leclerc, E., 2014b. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* doi:10.1016/j.tiv.2014.02.005
- Carrière, V., Chambaz, J., Rousset, M., 2001. Intestinal responses to xenobiotics. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 15, 373–378.
- Choucha Snouber, L., Griscom, L., Poleni, P., Razan, F., Brochot, C., Animat, C., Corlu, A., Legallais, C., Leclerc, E., 2011. liver-kidney microfluidic bioreactor for cell co-culture in drug studies, in: MICROTAS. GRONINGEN, Pays-Bas, p. 0328.
- Ferrell, N., Desai, R.R., Fleischman, A.J., Roy, S., Humes, H.D., Fissell, W.H., 2010. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance

- (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 707–716. doi:10.1002/bit.22835
- Gavhane, Y.N., Yadav, A.V., 2012. Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharm. J.* 20, 331–344. doi:10.1016/j.jsps.2012.03.005
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457–472. doi:10.1214/ss/1177011136
- Gertz, M., Harrison, A., Houston, J.B., Galetin, A., 2010. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 38, 1147–1158. doi:10.1124/dmd.110.032649
- Ghaemmaghami, A.M., Hancock, M.J., Harrington, H., Kaji, H., Khademhosseini, A., 2012. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discov. Today* 17, 173–181. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.029
- Groneberg, D.A., Grosse-Siestrup, C., Fischer, A., 2002. In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 30, 394–399.
- Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2010. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 640, 1–40. doi:10.1007/978-1-60761-688-7_1
- Hamon, J., Jennings, P., Bois, F.Y., 2013. Integration of Omics Data and Systems Biology Modeling: Effect of Cyclosporine A on the Nrf2 Pathway in Human Renal Kidneys Cells. *ArXiv13124744 Q-Bio*.
- Hoganson, D.M., Bassett, E.K., Vacanti, J.P., 2014. Lung tissue engineering. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 19, 1227–1239.
- Imura, Y., Asano, Y., Sato, K., Yoshimura, E., 2009. A microfluidic system to evaluate intestinal absorption. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 25, 1403–1407.
- Ito, K., Houston, J.B., 2004. Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm. Res.* 21, 785–792.
- Jang, K.-J., Mehr, A.P., Hamilton, G.A., McPartlin, L.A., Chung, S., Suh, K.-Y., Ingber, D.E., 2013. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr. Biol.* 5, 1119–1129. doi:10.1039/C3IB40049B
- Kato, M., 2008. Intestinal first-pass metabolism of CYP3A4 substrates. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23, 87–94.
- Kim, H.J., Ingber, D.E., 2013. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 5, 1130–1140. doi:10.1039/c3ib40126j
- Lau, Y.Y., Chen, Y.-H., Liu, T.-T., Li, C., Cui, X., White, R.E., Cheng, K.-C., 2004. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 32, 937–942.
- Leclerc, E., Sakai, Y., Fujii, T., 2004. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol. Prog.* 20, 750–755. doi:10.1021/bp0300568
- Legendre, A., Baudoin, R., Alberto, G., Paullier, P., Naudot, M., Bricks, T., Brocheton, J., Jacques, S., Cotton, J., Leclerc, E., 2013. Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. *J. Pharm. Sci.* 102, 3264–3276. doi:10.1002/jps.23466
- Lin, J.H., Chiba, M., Baillie, T.A., 1999. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol. Rev.* 51, 135–158.

- Mahler, G.J., Esch, M.B., Glahn, R.P., Shuler, M.L., 2009. Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 193–205. doi:10.1002/bit.22366
- Mazzei, D., Guzzardi, M.A., Giusti, S., Ahluwalia, A., 2010. A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 127–137. doi:10.1002/bit.22671
- McGinnity, D.F., Soars, M.G., Urbanowicz, R.A., Riley, R.J., 2004. Evaluation of Fresh and Cryopreserved Hepatocytes as in Vitro Drug Metabolism Tools for the Prediction of Metabolic Clearance. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1247–1253. doi:10.1124/dmd.104.000026
- Midwoud, P.M. van, Verpoorte, E., Groothuis, G.M.M., 2011. Microfluidic devices for in vitro studies on liver drug metabolism and toxicity. *Integr. Biol.* 3, 509–521. doi:10.1039/C0IB00119H
- Millet, L.J., Gillette, M.U., 2012. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci.* 35, 752–761. doi:10.1016/j.tins.2012.09.001
- Paixão, P., Gouveia, L.F., Morais, J.A.G., 2012. Prediction of the human oral bioavailability by using in vitro and in silico drug related parameters in a physiologically based absorption model. *Int. J. Pharm.* 429, 84–98. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.03.019
- Pang, K.S., Rowland, M., 1977a. Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the “well-stirred” model over the “parallel tube” model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5, 655–680.
- Pang, K.S., Rowland, M., 1977b. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a “well-stirred” model and a “parallel tube” model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5, 625–653.
- Prot, J.M., Aninat, C., Griscom, L., Razan, F., Brochot, C., Guillouzo, C.G., Legallais, C., Corlu, A., Leclerc, E., 2011. Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1704–1715. doi:10.1002/bit.23104
- Prot, J.-M., Bunescu, A., Elena-Herrmann, B., Aninat, C., Snouber, L.C., Griscom, L., Razan, F., Bois, F.Y., Legallais, C., Brochot, C., Corlu, A., Dumas, M.E., Leclerc, E., 2012. Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic “on chip” approaches: application to acetaminophen injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 270–280. doi:10.1016/j.taap.2011.12.017
- Prot, J.M., Maciel, L., Bricks, T., Merlier, F., Cotton, J., Paullier, P., Bois, F.Y., Leclerc, E., 2014. First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol. Bioeng.* doi:10.1002/bit.25232
- Prot, J.-M., Videau, O., Brochot, C., Legallais, C., Bénech, H., Leclerc, E., 2011. A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening. *Int. J. Pharm.* 408, 67–75. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.054
- Shibata, Y., Takahashi, H., Chiba, M., Ishii, Y., 2002. Prediction of hepatic clearance and availability by cryopreserved human hepatocytes: an application of serum incubation method. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 30, 892–896.

- Sin, A., Chin, K.C., Jamil, M.F., Kostov, Y., Rao, G., Shuler, M.L., 2004. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol. Prog.* 20, 338–345. doi:10.1021/bp034077d
- Soldatow, V.Y., Lecluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I., 2013. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res.* 2, 23–39. doi:10.1039/C2TX20051A
- Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., Pang, K.S., 2008. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 395–411. doi:10.1517/17425255.4.4.395
- Tassaneeyakul, W., Tassaneeyakul, W., Vannaprasaht, S., Yamazoe, Y., 2000. Formation of omeprazole sulphone but not 5-hydroxyomeprazole is inhibited by grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 139–144. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00122.x
- Thummel, K.E., Kunze, K.L., Shen, D.D., 1997. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv. Drug Deliv. Rev., First-pass Metabolism and Its Impact on Oral Drug Delivery* 27, 99–127. doi:10.1016/S0169-409X(97)00039-2
- Thummel, K.E., O'Shea, D., Paine, M.F., Shen, D.D., Kunze, K.L., Perkins, J.D., Wilkinson, G.R., 1996. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism*. *Clin. Pharmacol. Ther.* 59, 491–502. doi:10.1016/S0009-9236(96)90177-0
- Zhang, D., Luo, G., Ding, X., Lu, C., 2012. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharm. Sin. B* 2, 549–561. doi:10.1016/j.apsb.2012.10.004
- Zuegge, J., Schneider, G., Coassolo, P., Lavé, T., 2001. Prediction of hepatic metabolic clearance: comparison and assessment of prediction models. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 553–563. doi:10.2165/00003088-200140070-00006

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE

L'optimisation et l'utilisation d'un dispositif tel que l'IIDMP (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) permettant d'associer une barrière intestinale à la culture de cellules hépatiques au sein de microsystèmes nécessitait de répondre à plusieurs objectifs. Ainsi, après la première étape de prise en main et d'optimisation des propriétés du dispositif, nous avons essayé de répondre à trois questions en particulier:

- Le fonctionnement de l'IIDMP altère-t-il la viabilité et la fonctionnalité des cellules qui y sont cultivées ?
- La coculture au sein du dispositif permet-elle de mettre en évidence des interactions entre les cellules intestinales et hépatiques ?
- Les résultats *in vitro* obtenus peuvent-ils permettre une bonne prédictibilité de la biodisponibilité orale des molécules testées ?

I. OPTIMISATION DU FONCTIONNEMENT DE L'IIDMP

1. Développement initial du dispositif

Lorsque ce doctorat a débuté, le dispositif de coculture IIDMP était utilisé dans une version qui permettait non seulement la perfusion des cellules hépatiques au sein des microsystèmes mais aussi de la barrière intestinale (Figure 17) [217]. Dans cette configuration, le compartiment intestinal (apical) était constitué de la face apicale de la barrière intestinale qui communiquait à un réservoir (puits n°3) par l'intermédiaire de deux tuyaux en PTFE. De même, le compartiment hépatique (basal) était constitué de la partie basale de la barrière intestinale (puits n°1), du microsystème, d'une autre réserve (puits n°2) et d'un tuyau qui permettait la bonne perfusion de ce compartiment.

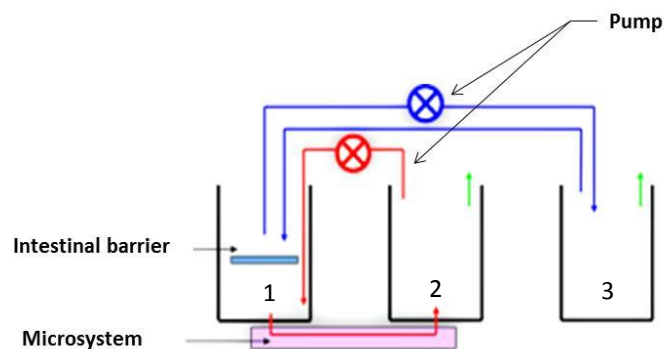


Figure 21 : Fonctionnement initial du dispositif de coculture intestin/foie. D'après Prot, J.M. et al. [217].

Toutefois, l'utilisation du dispositif sous ce format comportait un certain nombre de défauts dont les deux principaux étaient :

- Un phénomène de dilution et d'adsorption des substances exposées en apical de la barrière intestinale et produites par les cellules. En effet, dans cette configuration, les volumes de milieux de culture des compartiments apicaux et basaux étaient fixés à 10 mL. De plus, l'utilisation de 3 puits de culture et de 3 tuyaux assurant la perfusion apicale et basale produisaient un phénomène d'adsorption non négligeable des substrats testés et des métabolites produits. Cette adsorption provenait des propriétés physicochimiques des matériaux constitutifs des puits de culture (polycarbonate), des tuyaux (PTFE) ou encore des microsystèmes (PDMS) [193].
- Un nombre limité de réplicats exploitables du fait de la survenue d'évènement indésirables comme une mauvaise perfusion des inserts et microsystèmes, un mauvais équilibre des volumes dans les différents puits de culture ou encore des problèmes d'étanchéité (en particulier au niveau des connecteurs inférieurs permettant de fixer les microsystèmes au dispositif).

Afin d'optimiser l'utilisation de l'IIDMP et de limiter ces défauts, un certain nombre de tests d'étanchéité et de perfusions des microsystèmes ont été effectués. Cette étanchéité dépend de nombreux facteurs comme la résistance des joints du dispositif aux expérimentations et la bonne connexion des microsystèmes au dispositif. Enfin, il fallait vérifier que cette étanchéité ainsi qu'un équilibre optimal du milieu entre les puits de culture étaient conservés même après de nombreuses phases d'autoclavage et d'incubation à une température de 37°C et une saturation en CO₂ de 5%.

Les performances du dispositif dans sa configuration initiale n'étaient pas optimales. Ainsi, l'utilisation du dispositif était initialement souvent synonyme d'apparition de fuites ou d'une mauvaise perfusion de certains microsystèmes. Toutes les biopuces ou microsystèmes concernés par ces fuites étaient considérés comme non utilisables. Plusieurs modifications ont alors permis d'améliorer le nombre de réplicats exploitables :

- L'arrêt de la perfusion du compartiment intestinal.
- L'addition de joints en silicone aux connecteurs permettant l'association des microsystèmes au dispositif.

Le dispositif finalement retenu et utilisé a été décrit plus en détail dans le matériel et méthodes de ce manuscrit.

2. Développements futurs du dispositif

Suite à cette première optimisation, d'autres améliorations du dispositif sont encore à ce jour en cours de développement. Quelques défauts inhérents au fonctionnement du dispositif ont été mis en évidence et soulignés dans les trois articles autour desquels s'est structuré ce doctorat. En particulier, l'un de ces facteurs était la dilution des molécules testées par les grands volumes de milieu de culture utilisés dans le compartiment hépatique de l'IIDMP (11 ml au total). Ainsi, les molécules étaient initialement exposées en apical de la barrière intestinale pour mimer une première absorption intestinale (et éventuellement un métabolisme) et étaient ensuite fortement diluées par le milieu de culture situé en basal de la barrière et dans le deuxième puits de culture.

De plus, cette dilution était conjuguée à une forte adsorption des molécules hydrophobes, comme cela a été montré avec la phénacétine et l'oméprazole, par le dispositif en lui-même (tuyaux, puits de culture, biopuces) [193] et par les éléments du milieu de culture utilisé (sérum, protéines etc...). Ces deux facteurs (dilution et adsorption) une fois conjugués entraînaient donc une baisse conséquente des concentrations auxquelles étaient exposés les hépatocytes cultivés dans les microsystèmes. Par conséquent, le choix des concentrations s'est révélé problématique car il fallait non seulement ne pas surexposer les cellules intestinales mais aussi permettre aux cellules hépatiques d'être exposées à une concentration suffisante de molécules parentes. Ces concentrations ne devaient pas être trop faibles à la fin des expérimentations afin de permettre leur dosage par spectrométrie de masse. Enfin, ce problème de dilution et d'adsorption entraînait une différence notable des

concentrations auxquelles étaient effectivement exposés les hépatocytes dans le cadre d'une coculture dynamique au sein de l'IIDMP ou de culture statique en boîtes de Pétri.

Pour limiter ce phénomène de dilution, une nouvelle version du dispositif a été proposée permettant de diminuer les tailles des puits et donc le volume des milieux de culture du compartiment hépatique d'un facteur 2. De même, un certain nombre de composés ont été testés afin de remplacer le PDMS des microsystèmes par d'autres matériaux associés à une moins grande adsorption des molécules testées. Ce dispositif et ces matériaux sont toutefois à l'heure actuelle en cours de tests.

II. EFFETS DE LA COCULTURE SUR LA VIABILITÉ ET FONCTIONNALITÉ DES CELLULES INTESTINALES ET HÉPATIQUES

Aussi bien après utilisation de cellules hépatiques de lignée (HepG2 C3A) que d'hépatocytes primaires humains, nous avons montré que la coculture dynamique pendant 24h n'induisait pas d'altération de la viabilité des cellules hépatiques. Ces résultats confirment ce qui avait été précédemment montré lors d'essais avec un autre dispositif appelé IDCCM (Integrated Insert in a Dynamic Microfluidic Platform) permettant la monoculture dynamique d'hépatocytes au sein de microsystèmes. En effet, plusieurs articles ont pu mettre en évidence que ce type de culture n'altérait pas la viabilité des hépatocytes que ce soit des cellules hépatiques de lignée [19] ou encore des hépatocytes primaires de rats [12] et humains [181].

Nous avons aussi montré que la coculture de cellules intestinales et hépatiques de lignée n'entraînait aucun changement en ce qui concerne la perméabilité et l'état des jonctions serrées de la barrière intestinale aussi bien par des tests qualitatifs (marquage des jonctions) que par des tests quantitatifs (passage de Jaune Lucifer et résistance transépithéliale) [13]. A l'opposé, lorsque les cellules hépatiques de lignées ont été remplacées par des hépatocytes primaires humains, nous avons observé une diminution de la résistance transépithéliale de la barrière intestinale et une augmentation de la perméabilité de ces cellules à la phénacétine et l'oméprazole [218]. Cette augmentation de perméabilité n'était pas due au milieu de culture (pas d'effet dans le cadre d'une monoculture classique des Caco-2 TC7) ni directement aux conditions dynamiques de culture (pas d'effet dans le cadre de la coculture Caco-2 TC7 et HepG2 C3A). Plusieurs hypothèses basées sur d'autres travaux ont été formulées pour expliquer cette augmentation de perméabilité :

- Un effet direct de molécules produites par les cellules hépatiques sur les cellules intestinales entraînant un relâchement des jonctions serrées intestinales.
- Un effet de molécules produites par les cellules hépatiques sur les cellules intestinales associé à une plus grande sensibilité des cellules intestinales au flux de milieu de culture du compartiment basal ou plus généralement au fonctionnement de l'IIDMP. En effet, il a été montré qu'un flux de milieu de culture pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité des Caco-2 organisées en barrière [219].

Toutefois, le flux de culture était dans notre cas relativement faible (25 $\mu\text{l}/\text{min}$) et situé uniquement en basal de la barrière intestinale.

Ces hypothèses restent à vérifier. Il serait ainsi possible de réaliser des cocultures statiques de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires humains dans des boîtes de Pétri pour voir si on observe cette augmentation de perméabilité même en l'absence de flux. La deuxième hypothèse pourrait alors être vérifiée en cultivant la barrière intestinale au sein de l'IIDMP sans y associer d'hépatocytes.

En ce qui concerne la production d'albumine par les hépatocytes, là aussi les résultats sont différents que l'on se place dans le cadre d'une coculture avec des cellules de lignée intestinales et hépatiques ou dans le cadre d'une coculture de cellules intestinales de lignée et d'hépatocytes primaires humains.

Dans le premier cas de figure, la production d'albumine est significativement supérieure après coculture dynamique au sein de l'IIDMP comparativement à ce qui a été trouvé après monoculture statique des hépatocytes en boîtes de Pétri ou encore dynamique au sein des microsystèmes (IDCCM) [13]. De manière intéressante, la production d'albumine par les HepG2 est aussi plus importante après monoculture dynamique au sein de l'IDCCM que ce qui a été montré lorsque ces cellules sont cultivées de manière statique dans des boîtes de Pétri [13]. Cela montre donc clairement, d'une part un effet de la culture dynamique et d'autre part, un effet de la coculture des cellules de lignées intestinales et hépatiques sur la production d'albumine par les hépatocytes.

Lorsque les HepG2 ont été remplacés par des hépatocytes primaires humains, nous avons observé une production d'albumine par les hépatocytes primaires humains cultivés aussi bien dans l'IIDMP que l'IDCCM ou encore en boîte de Pétri, bien plus forte que celle reportée dans la littérature et produite par des hépatocytes primaires de rat en bioréacteur [12,220] ou encore que ce que nous avons observé après culture des HepG2 C3A au sein de l'IDCCM et de l'IIDMP [13].

L'augmentation consécutive à une culture dynamique et à une coculture intestin/foie n'a toutefois pas été observée. En effet, la production d'albumine est sensiblement la même que l'on se place dans le cadre de la coculture dynamique ou dans celui de la monoculture statique et dynamique d'hépatocytes primaires humains.

Les raisons expliquant cette différence restent donc à explorer, d'autant plus que d'autres équipes avaient montré une augmentation de la production d'albumine notamment par des hépatocytes primaires de rat, lorsque ceux-ci étaient soumis à un flux de milieu de culture [220].

III. EFFETS DE LA COCULTURE SUR L'ACTIVITÉ DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES DES CELLULES

L'utilisation de microsystemes pour cultiver de manière dynamique des hépatocytes a pour objectif de proposer une alternative à la culture en boîtes de Pétri. En effet, plusieurs phénomènes sont observés dans ce cadre comme une dédifférenciation des hépatocytes primaires aboutissant, entre autres, à une diminution de l'activité de leurs enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) [123]. Pour limiter ce problème entraînant à terme une mauvaise prédictibilité du métabolisme des xénobiotiques, il est possible de remplacer les hépatocytes primaires par des cellules hépatiques de lignées plus stables, plus simples d'utilisation, moins coûteuses et dont les résultats sont moins variables [127]. L'utilisation de lignées cellulaires présente toutefois de nombreux défauts comme une faible activité basale de certaines de ces EMX [126,130].

Il a été montré précédemment que la culture dynamique des cellules de lignée au sein des microsystemes et dans le dispositif IDCCM permettait d'améliorer l'activité des EMX de ces cellules tout en préservant leur viabilité [11]. De plus, lorsque des hépatocytes primaires de rats [12] ou humains [21] étaient cultivés au sein de l'IDCCM, l'expression de certaines EMX (en quantité d'ARNm) semblait plus stable, voire plus importante, sur des temps de culture allant jusqu'à 96h que ce qui avait été observé en utilisant des boîtes de Pétri. D'autres publications ont montré que la coculture intestin/foie était associée à la suractivation en particulier des CYP1A des cellules hépatiques [190,221].

Nous avons voulu vérifier si nous pouvions observer d'une part l'influence de la culture dynamique en microsystemes et d'autre part de la coculture intestin/foie sur l'activité des EMX des cellules hépatiques. Pour cela, nous avons choisi notamment de cibler l'activité du CYP1A2. En effet, nous avons montré précédemment que l'activité de ce CYP était augmentée lorsque les cellules hépatiques de lignée (HepG2 C3A) étaient soumises à un flux de culture et cultivées dans les microsystemes [11]. De manière intéressante, nous avons de même observé cette suractivation du CYP1A2 des HepG2 lorsqu'elles étaient cultivées au sein de l'IDCCM et une suractivation encore supérieure lorsqu'elles étaient associées dans l'IIDMP à des cellules intestinales de lignée (Caco-2 TC7). Ces résultats

confirment ceux obtenus par Choi, S.H. *et al.* dans le cadre d'une coculture de Caco-2 et de HepG2 [190]. En effet, il avait été mis en évidence une augmentation de l'activité du CYP1A1/2 des HepG2 que ce soit dans le cadre d'une coculture statique ou dynamique.

Lorsque les HepG2 étaient remplacées par des hépatocytes primaires humains et cultivées avec des Caco-2 TC7, nous avons aussi observé cette suractivation du CYP1A2 comparativement à la monoculture dynamique des hépatocytes au sein de l'IDCCM (en termes de ratios métaboliques et de clairances) ou en boîtes de Pétri (en termes de clairances). Cette suractivation s'est plus particulièrement traduite par une meilleure clairance hépatique de la phénacétine en paracétamol par les hépatocytes primaires cultivés au sein de l'IIDMP que celle observée lorsque ces cellules étaient cultivées dans l'IDCCM ou en boîte de Pétri [218].

Cette différence significative entre monoculture dynamique (IDCCM) et coculture dynamique (IIDMP) ne semble pas être due à la contribution des Caco-2 TC7 puisque nous n'avons pas mesuré d'activité des CYP1A (CYP1A1 et CYP1A2) de ces cellules. Pour expliquer cette différence, deux hypothèses principales ont été émises :

- Un effet dû au mode d'exposition propre au dispositif de coculture IIDMP (en apical de la barrière intestinale puis dilution des molécules dans le compartiment basal). Toutefois, cela n'explique pas pourquoi cet effet n'a pas été observé avec les CYP2C19 et CYP3A4 des cellules hépatiques et intestinales.
- Un effet synergique des cellules intestinales et des cellules hépatiques qui pourrait entraîner par exemple une plus grande sensibilité des hépatocytes au flux de culture. Toutefois, cette augmentation de l'activité du CYP1A2 de cellules hépatiques (HepG2) a aussi été mise en évidence dans le cadre d'une coculture statique de Caco-2 et d'HepG2 [190]. Il est donc possible que les Caco-2 et Caco-2 TC7 produisent des molécules entraînant directement une augmentation de l'activité du CYP1A2 des cellules hépatiques, indépendamment de l'effet de la culture dynamique.

Il semblerait donc que l'on peut tirer deux conclusions de l'effet d'une coculture intestin/foie au sein de l'IIDMP:

- La culture dynamique au sein des microsystèmes (IDCCM) permet d'améliorer l'activité des CYP1A (CYP1A1 et CYP1A2) des HepG2.

- La coculture intestin/foie au sein de l'IIDMP augmente l'activité du CYP1A2 des cellules hépatiques de lignée et des hépatocytes primaires humains comparativement à ce qui a été montré après monoculture de ces mêmes cellules dans l'IDCCM ou encore en boîte de Pétri.

Toutefois, l'effet de la culture dynamique en microsystemes sur le CYP1A2 des HepG2 cultivées en monoculture (IDCCM) n'a pas été observé lorsque ces cellules étaient remplacées par des hépatocytes primaires humains. De plus, l'activité du CYP2C19 et celle du CYP3A4 étaient similaires (en termes de ratios métaboliques) que l'on se place dans le cadre de culture dynamique au sein de l'IDCCM ou après une coculture au sein de l'IIDMP. Afin d'étudier de manière plus précise l'influence de la coculture dynamique sur l'expression des EMX, il serait nécessaire de réaliser un certain nombre d'expérimentations complémentaires. Il serait ainsi possible d'effectuer des RTqPCR afin de mesurer l'expression des gènes codant pour ces EMX en condition dynamique de culture et/ou lors d'une coculture de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires humains. De potentielles augmentations ou diminutions de ces activités pourraient alors être confirmées au niveau protéique. Par ce biais, il serait aussi possible d'étudier les voies de régulation aboutissant à ces modifications d'expression.

IV. PERTINENCE DU DISPOSITIF IIDMP ET DU MODELE PK ASSOCIE

Dans le cadre des études pharmacocinétiques reposant sur l'utilisation de méthodes *in vitro* et *in silico*, les effets de premiers passages intestinaux (et plus généralement extra hépatiques) sont bien souvent sous-estimés. En effet, ces études reposent la plupart du temps sur l'utilisation de résultats obtenus à l'aide d'hépatocytes cultivés en suspension, en monocouche ou de ceux obtenus à partir de cultures de microsomes hépatiques [195]. Les prédictions des biodisponibilités orales associées à ces résultats ont donc tendance à sous-estimer les biodisponibilités orales *in vivo* de ces molécules.

Lorsque ces effets intestinaux sont pris en compte dans les calculs et extrapolations des biodisponibilités orales, ils proviennent de résultats issus d'expérimentations *in vitro* pratiquées séparément sur des cellules intestinales (Caco-2 généralement) d'une part et sur des cellules hépatiques d'autre part. De plus, l'effet de l'intestin sur la biodisponibilité est alors réduit à la perméabilité des cellules intestinales aux molécules ce qui ne prend pas en compte d'éventuels métabolismes intestinaux [196, 197].

Nous avons proposé au sein du troisième article intégré à ce manuscrit de prendre en compte la perméabilité et le métabolisme intestinal ainsi que le métabolisme hépatique dans les calculs de biodisponibilités au sein d'un même modèle PK.

Toutefois, les résultats obtenus ont montré que les molécules choisies étaient d'une part, rapidement et presque intégralement absorbées, et d'autre part, peu métabolisées par la barrière intestinale. Les biodisponibilités orales prédites par le modèle et associées à l'utilisation de ces molécules étaient donc principalement influencées par le métabolisme hépatique et très peu par le métabolisme intestinal. Les biodisponibilités orales calculées sont donc sous-estimées par rapport aux biodisponibilités observées *in vivo*. Cela peut être expliqué par les propriétés des molécules utilisées, rapidement absorbées *in vivo* et par les capacités métaboliques des Caco-2 TC7 utilisées dont les CYPs sont peu exprimées [222]. Enfin, ce modèle a permis de prendre en compte les effets intestinaux mais pas d'autres effets extra hépatiques responsables d'une limitation notable de la biodisponibilité orale des molécules comme l'excrétion biliaire et rénale.

Pour valider la pertinence du dispositif IIDMP et du modèle PK dont une des utilités est de mettre en évidence d'éventuels effets de premiers passages intestinaux, il serait nécessaire de prédire la biodisponibilité de molécules moyennement ou faiblement absorbées par l'intestin et/ou fortement métabolisées par l'intestin. De même, il serait intéressant d'améliorer les performances métaboliques des cellules intestinales par l'utilisation, par exemple, d'inducteurs des EMX d'intérêt. En effet, l'utilisation des Caco-2 TC7 afin de reproduire les effets métaboliques de premiers passages intestinaux est limitée par les capacités métaboliques et par l'activité des transporteurs de ces cellules [222].

La comparaison de nos prédictions à celles obtenues par l'utilisation de méthodes *in vitro* classiques et à celles observées *in vivo*, pourrait alors nous permettre de conclure quant aux capacités prédictives de notre dispositif dans un but de calcul de biodisponibilités orales.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce doctorat a donc permis de tester et d'améliorer un dispositif de culture *in vitro* innovant permettant de mimer l'activité de l'intestin et du foie et les effets de premier passage liés à l'activité métabolique de ces deux organes. Pour se faire, trois étapes se sont succédées :

- La première a consisté en l'optimisation de son fonctionnement par des tests d'étanchéité et fluidiques.
- La deuxième a consisté à l'utiliser en y associant des cellules intestinales (Caco-2 TC7) et hépatiques de lignées (HepG2 C3A), robustes mais dont le phénotype et les capacités métaboliques s'éloignent de ce que l'on retrouve *in vivo*. Cette phase nous a permis de vérifier la fonctionnalité et l'innocuité du dispositif. Elle nous a aussi permis d'observer un effet de la culture dynamique en microsystemes et un effet de la coculture sur l'activité hépatique du CYP1A2.
- La troisième a consisté en l'association de cellules intestinales de lignée (Caco-2 TC7) et d'hépatocytes primaires humains. Cette étape nous a permis de confirmer la suractivation hépatique du CYP1A2 ainsi que de mettre en évidence d'autres phénomènes comme une augmentation de la perméabilité des cellules intestinales lorsque cellules intestinales et hépatocytes primaires humains étaient associés au sein du dispositif. Toutefois, l'effet de la culture dynamique sur les hépatocytes primaires humains n'a pas été mis en évidence contrairement à ce qui avait été montré par l'utilisation des HepG2 C3A. Cette étape a aussi permis non seulement d'intégrer les résultats de perméabilité intestinal mais aussi de métabolisme intestinal et hépatique obtenus avec l'IIDMP au sein d'un modèle PK. Par ce biais, il a été possible d'estimer les biodisponibilités orales des molécules testées.

Un certain nombre d'interrogations reste toutefois sans réponse et y répondre nécessiterait des expérimentations complémentaires. Il serait ainsi pertinent de confirmer et d'étudier l'origine de cet effet synergique observé entre cellules intestinales et hépatiques sur le CYP1A2 des hépatocytes et la résistance transépithéliale des Caco-2 TC7. En effet, cette augmentation de l'activité du CYP1A2 hépatique a été mise en évidence après

coculture et après culture dynamique des HepG2 C3A, cependant la cause de cette augmentation reste hypothétique. De plus, aucun effet du flux sur l'activité du CYP1A2 n'a été mesuré lorsque des hépatocytes primaires humains étaient cultivés en monoculture au sein de l'IDCCM. Au contraire, une coculture de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires humains étaient associés à une augmentation de l'activité hépatique de ce CYP. Il semblerait donc y avoir un effet de la culture dynamique et un effet de la coculture sur l'activité du CYP1A2 dont les mécanismes d'induction sont potentiellement différents.

Il a également été observé une diminution de la résistance transépithéliale des Caco-2 TC7 lorsque ces cellules étaient associées à la culture des hépatocytes primaires humains au sein du dispositif IIDMP. Cette diminution ne peut pas être due au flux de culture puisque la résistance transépithéliale des Caco-2 TC7 ne variait pas lorsque ces cellules étaient cultivées de manière dynamique au sein de l'IIDMP avec des HepG2 C3A. Il est donc fortement probable que cette diminution soit due à la coculture avec des hépatocytes primaires humains.

Pour vérifier ces hypothèses, il serait possible d'étudier les variations de cette résistance transépithéliale et du CYP1A2 hépatique lorsque les Caco-2 TC7 sont cultivées en présence d'hépatocytes primaires au sein de boîtes de Petri classiques. L'origine d'une éventuelle interaction pourrait alors être explorée à l'aide d'études protéomiques et génomiques complémentaires. En effet, il est maintenant connu que l'activation de certains xénosenseurs comme AhR entraîne une induction de l'activité des CYP1A [223].

Les effets de la coculture dynamique ont été testés sur un court terme. Or, un des objectifs du dispositif de coculture est de proposer un dispositif *in vitro* permettant de cultiver et de conserver l'activité métabolique des cellules hépatiques sur un long terme, un enjeu crucial notamment dans le cadre de tests de pharmacocinétique et de toxicologie. En effet, comme décrit précédemment, l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques des hépatocytes primaires humains cultivés dans des conditions classiques de culture (Petri) a tendance à diminuer au cours du temps de culture. Il serait donc intéressant d'effectuer une coculture de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires humains sur des temps supérieurs à 72h et de mesurer l'activité métabolique des hépatocytes primaires afin de comparer ces activités à celles mesurées après 24h de perfusion et de coculture.

Une autre perspective serait de tester l'effet de la coculture dynamique sur d'autres EMX que celles testées lors de ce doctorat (EMX de phase I). Il serait ainsi possible de suivre l'activité d'EMX de phase 2 ou de transporteurs et de caractériser leur activité hépatique et intestinale dans le cadre d'une coculture dynamique de Caco-2 TC7 et d'hépatocytes primaires humains. En effet, il a été montré que soumettre des hépatocytes primaires humains à un flux de culture pouvait entraîner une augmentation de l'activité des EMX de phase II et des transporteurs [7].

Dans le but de vérifier la pertinence du dispositif et du modèle PK associé, il serait particulièrement intéressant de tester l'absorption et le métabolisme de molécules peu absorbées et/ou fortement métabolisées par la barrière intestinale. Il serait alors possible de comparer les résultats de biodisponibilités associés à l'absorption et au métabolisme de ces molécules à ceux obtenus *in vitro* par l'utilisation de méthodes classiques (hépatocytes en suspension, microsomes hépatiques) et aux résultats de la littérature *in vivo*. Cela permettrait de mettre en évidence la capacité du dispositif à mimer les effets de premiers passages intestinaux qui peuvent *in vivo* grandement limiter la biodisponibilité de médicaments [224]. Il serait alors possible de conclure quant à l'intérêt du dispositif IIDMP en tant que méthode alternative permettant d'obtenir des résultats plus prédictibles que les méthodes *in vitro* classiques.

Enfin, ce dispositif permet d'associer une barrière à la culture de cellules en microsystèmes. Après avoir testé une configuration de type intestin/foie, il serait possible d'y cultiver les autres épithéliums principalement impliqués dans l'entrée des xénobiotiques au sein de l'organisme. Les configurations utilisées seraient alors de type épithélium bronchique/foie ou encore barrière cutanée/foie. Il serait aussi intéressant de coupler la culture des cellules hépatiques à celle d'une barrière rénale ou encore sertolienne. Ce dernier couplage est d'ailleurs en cours d'étude et permet d'étudier les effets reprotoxiques de xénobiotiques de type pesticides.

La culture des cellules hépatiques au sein des microsystèmes pourraient aussi être associée à celle de fibroblastes ou encore de cellules endothéliales. En effet, il a été montré que ce

type de culture permettait d'améliorer et de maintenir l'activité des hépatocytes dans un but d'étude du métabolisme des xénobiotiques [225,226].

REFERENCES

- 1 Ghaemmaghami, A.M. *et al.* (2012) Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discovery Today* 17, 173–181
- 2 Bhushan, A. *et al.* (2013) Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans. *Stem Cell Res Ther* 4 Suppl 1, S16
- 3 Tilles, A.W. *et al.* (2001) Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 379–389
- 4 Allen, J.W. and Bhatia, S.N. (2005) Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 253–262
- 5 Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C. (2008) Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 1279–1294
- 6 Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A. (2010) General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol. Biol.* 640, 1–40
- 7 Vinci, B. *et al.* (2011) Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: Medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnology Journal* 6, 554–564
- 8 Walker, T.M. and Woodroffe, A.J. (2001) Cytochrome P450 activity in control and induced long-term cultures of rat hepatocyte spheroids. *Toxicol In Vitro* 15, 713–719
- 9 Ambrosino, G. *et al.* (2005) Isolated hepatocytes versus hepatocyte spheroids: in vitro culture of rat hepatocytes. *Cell Transplant* 14, 397–401
- 10 Kern, A. *et al.* (1997) Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem. Pharmacol.* 54, 761–772
- 11 Prot, J.M. *et al.* (2011) Improvement of HepG2/C3a cell functions in a microfluidic biochip. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1704–1715
- 12 Legendre, A. *et al.* (2013) Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips. *J Pharm Sci* 102, 3264–3276
- 13 Bricks, T. *et al.* (2014) Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol In Vitro* DOI: 10.1016/j.tiv.2014.02.005
- 14 Claverie-Morin, I. *et al.* (2008) *Pharmacologie générale, toxicologie: mécanismes fondamentaux*, Wolters Kluwer France.
- 15 Clère, N. *et al.* (2014) *Bases fondamentales en pharmacologie: Sciences du médicament*, Elsevier Health Sciences France.
- 16 Williams, P.L. *et al.* (2003) *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, John Wiley & Sons.
- 17 Leclerc, E. *et al.* (2003) Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices* 5, 109–114
- 18 Leclerc, E. *et al.* (2004) Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol. Prog.* 20, 750–755
- 19 Baudoin, R. *et al.* (2012) Parallelized microfluidic biochips in multi well plate applied to liver tissue engineering. *Sensors and Actuators B: Chemical* 173, 919–926
- 20 Prot, J.-M. *et al.* (2012) Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic “on chip” approaches: application to acetaminophen injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 270–280

- 21 Baudoin, R. *et al.* (2014) Evaluation of a liver microfluidic biochip to predict in vivo clearances of seven drugs in rats. *J Pharm Sci* 103, 706–718
- 22 Tolson, A.H. and Wang, H. (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1238–1249
- 23 Michel, V. (2007) *Médicaments*, Wolters Kluwer France.
- 24 Shitara, Y. *et al.* (2006) Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27, 425–446
- 25 Hunter, J. and Hirst, B.H. (1997) Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25, 129–157
- 26 Coleman, M.D. (2010) *Human Drug Metabolism: An Introduction*, John Wiley & Sons.
- 27 Keogh, J.P. (2012) Membrane Transporters in Drug Development. In *Advances in Pharmacology* Volume 63 (Gabrielle M. Hawksworth, ed), pp. 1–42, Academic Press
- 28 Szakács, G. *et al.* (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). *Drug Discovery Today* 13, 379–393
- 29 GOULLÉ, M.L., Jean-Pierre *Toxicologie industrielle*, Ed. Techniques Ingénieur.
- 30 Guéguen, Y. *et al.* (2006) [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64, 535–548
- 31 Gueguen, Y. *et al.* Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de biologie clinique* 64, 535–548
- 32 Gibbs, M.A. *et al.* (1999) Inhibition of Cytochrome P-450 3A (CYP3A) in Human Intestinal and Liver Microsomes: Comparison of K_i Values and Impact of CYP3A5 Expression. *Drug Metab Dispos* 27, 180–187
- 33 Mudra, D.R. *et al.* (2011) In silico, in vitro and in situ models to assess interplay between CYP3A and P-gp. *Curr. Drug Metab.* 12, 750–773
- 34 Chen, Y. *et al.* (2012) Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1112–1126
- 35 Vaubourdolle, M. (2007) *Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques*, Wolters Kluwer France.
- 36 Lee, J.S. *et al.* (1994) Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* 46, 627–638
- 37 Kintz, P. (1998) *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Elsevier Masson.
- 38 Ganong, W. (2005) *Physiologie médicale*, De Boeck Supérieur.
- 39 Betton, G.R. (2013) A review of the toxicology and pathology of the gastrointestinal tract. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 321–338
- 40 Marieb, E.N. and Hoehn, K. (2010) *Anatomie et physiologie humaines*, ERPI.
- 41 Lennernäs, H. (2007) Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica* 37, 1015–1051
- 42 Wolf, K.K. *et al.* (2010) 10.05 - Metabolic Barrier of the Gastrointestinal Tract. In *Comprehensive Toxicology* (Second Edition) (McQueen, C. A., ed), pp. 53–75, Elsevier
- 43 Jeong, H.G. *et al.* (2013) Role of intestinal microflora in xenobiotic-induced toxicity. *Mol Nutr Food Res* 57, 84–99
- 44 Lodish, H. *et al.* (2005) *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck Supérieur.
- 45 Veshnyakova, A. *et al.* (2010) On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)* 2, 1336–1356

- 46 Tirelli, V. *et al.* (2007) Effects of the pesticide clorpyrifos on an in vitro model of intestinal barrier. *Toxicol In Vitro* 21, 308–313
- 47 Hidalgo, I.J. *et al.* (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749
- 48 Chow, E.C.Y. and Pang, K.S. (2013) Why we need proper PBPK models to examine intestine and liver oral drug absorption. *Curr. Drug Metab.* 14, 57–79
- 49 Estudante, M. *et al.* (2013) Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 1340–1356
- 50 Mudra, D.R. *et al.* (2011) In silico, in vitro and in situ models to assess interplay between CYP3A and P-gp. *Curr. Drug Metab.* 12, 750–773
- 51 Tamaki, A. *et al.* (2011) The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem.* 50, 209–232
- 52 Sharom, F.J. (2011) The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 50, 161–178
- 53 Van de Waterbeemd, H. and Gifford, E. (2003) ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* 2, 192–204
- 54 Pavek, P. and Dvorak, Z. (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.* 9, 129–143
- 55 Coleman, M.D. (2010) *Human Drug Metabolism: An Introduction*, John Wiley & Sons.
- 56 *Encyclopedia of Human Body Systems*, ABC-CLIO.
- 57 Encyclopédie Larousse en ligne - appareil digestif. . [Online]. Available: http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/appareil_digestif/43467. [Accessed: 02-Apr-2014]
- 58 LeCluyse, E.L. *et al.* (2012) Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol* 42, 501–548
- 59 Patton, K.T. and Thibodeau, G.A. (2014) *Mosby's Handbook of Anatomy & Physiology*, Elsevier Health Sciences.
- 60 Köck, K. and Brouwer, K.L.R. (2012) A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 599–612
- 61 The Principles of Humane Experimental Technique. , *Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health*. [Online]. Available: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc. [Accessed: 30-Sep-2013]
- 62 Directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques,
- 63 Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques,
- 64 Code rural, articles R214-87 à R214-137
- 65 Williams, P.L. *et al.* (2003) *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, John Wiley & Sons.
- 66 Berndt, E.R. *et al.* (2005) *Opportunities for Improving the Drug Development Process: Results from a Survey of Industry and the FDA*, National Bureau of Economic Research.
- 67 DiMasi, J.A. (2002) The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics* 20 Suppl 3, 1–10

- 68 Polli, J.E. (2008) In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J* 10, 289–299
- 69 Chaturvedi, P.R. *et al.* (2001) Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 452–463
- 70 Schroeder, K. *et al.* (2011) Report from the EPAA workshop: In vitro ADME in safety testing used by EPAA industry sectors. *Toxicology in Vitro* 25, 589–604
- 71 Krewski, D. *et al.* (2010) Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 13, 51–138
- 72 Demetrius, L. (2006) Aging in mouse and human systems: a comparative study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 66–82
- 73 Barber, E.D. *et al.* (1992) A comparative study of the rates of in vitro percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. *Fundamental and Applied Toxicology* 19, 493–497
- 74 Ross, J.H. *et al.* (2005) Dermal absorption of 2,4-D: a review of species differences. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 41, 82–91
- 75 Zhao, Y.H. *et al.* (2003) Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption. *Eur J Med Chem* 38, 233–243
- 76 Cao, X. *et al.* (2006) Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm. Res.* 23, 1675–1686
- 77 Antunes, F. *et al.* (2013) Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Curr. Drug Metab.* 14, 4–20
- 78 Groneberg, D.A. *et al.* (2002) In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 30, 394–399
- 79 Soldatow, V.Y. *et al.* (2013) In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2, 23–39
- 80 Fasinu, P. *et al.* (2012) Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr. Drug Metab.* 13, 215–224
- 81 Bohets, H. *et al.* (2001) Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem* 1, 367–383
- 82 Van de Kerkhof, E.G. *et al.* (2006) Innovative methods to study human intestinal drug metabolism in vitro: precision-cut slices compared with ussing chamber preparations. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1893–1902
- 83 Le Ferrec, E. *et al.* (2001) In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* 29, 649–668
- 84 Barthe, L. *et al.* (1999) Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol* 13, 154–168
- 85 Barthe, L. *et al.* (1998) The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International Journal of Pharmaceutics* 173, 255–258
- 86 Niu, X. *et al.* (2013) Evaluation of the intestinal toxicity and transport of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica* 43, 73–83
- 87 Groothuis, G.M.M. and de Graaf, I.A.M. (2013) Precision-cut intestinal slices as in vitro tool for studies on drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 14, 112–119

- 88 Ussing, H.H. and Zerahn, K. (1999) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from *Acta. Physiol. Scand.* 23: 110-127, 1951. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2056–2065
- 89 Sips AJAM, V.C. Methodologies to study human intestinal absorption. A review. . [Online]. Available: http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/2000/december/Methodologies_to_study_human_intestinal_absorption_A_review?sp=cml2bXE9ZmFs c2U7c2VhcmNoYmFzZT0yMjQ5MDtyaXZtcT1mYWxzZTs=&pagenr=2250. [Accessed: 22-Mar-2014]
- 90 Söderholm, J.D. *et al.* (1998) Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. *Acta Physiol. Scand.* 162, 47–56
- 91 Plumb, J.A. *et al.* (1987) A comparison of the structural integrity of several commonly used preparations of rat small intestine in vitro. *Clin. Sci.* 73, 53–59
- 92 Maier-Salamon, A. *et al.* (2009) Hepatic metabolism and biliary excretion of valerenic acid in isolated perfused rat livers: role of Mrp2 (Abcc2). *J Pharm Sci* 98, 3839–3849
- 93 Ahmed, S. *et al.* (2008) Involvement of Mrp2 (Abcc2) in biliary excretion of moxifloxacin and its metabolites in the isolated perfused rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 55–62
- 94 Lerche-Langrand, C. and Toutain, H.J. (2000) Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology* 153, 221–253
- 95 Smith, P.F. *et al.* (1986) Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22, 706–712
- 96 Toutain, H.J. *et al.* (1998) Morphological and functional integrity of precision-cut rat liver slices in rotating organ culture and multiwell plate culture: effects of oxygen tension. *Cell Biol. Toxicol.* 14, 175–190
- 97 Fisher, R.L. *et al.* (1995) Dynamic Organ Culture is Superior to Multiwell Plate Culture for Maintaining Precision-Cut Tissue Slices: Optimization of Tissue Slice Culture, Part 1. *Toxicology Mechanisms and Methods* 5, 99–113
- 98 Polli, J.E. (2008) In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J* 10, 289–299
- 99 Balimane, P.V. *et al.* (2000) Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44, 301–312
- 100 Nichols, J. *et al.* (2007) Use of In Vitro Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Bioaccumulation Assessments for Fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 13, 1164–1191
- 101 Sugano, K. *et al.* (2001) High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J Biomol Screen* 6, 189–196
- 102 Moyer, M.P. (1983) Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 174, 12–15
- 103 Avdeef, A. and Tam, K.Y. (2010) How well can the Caco-2/Madin-Darby canine kidney models predict effective human jejunal permeability? *J. Med. Chem.* 53, 3566–3584
- 104 Tavelin, S. *et al.* (2003) Prediction of the Oral Absorption of Low-Permeability Drugs Using Small Intestine-Like 2/4/A1 Cell Monolayers. *Pharm Res* 20, 397–405
- 105 Lesuffleur, T. *et al.* (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 50, 6334–6343

- 106 Simon-Assmann, P. *et al.* (2007) In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* 23, 241–256
- 107 Pontier, C. *et al.* (2001) HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.* 90, 1608–1619
- 108 Hilgendorf, C. *et al.* (2000) Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci* 89, 63–75
- 109 Chen, X.-M. *et al.* (2010) Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61, 334–342
- 110 Alqahtani, S. *et al.* (2013) Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9, 1241–1254
- 111 Prueksaritanont, T. *et al.* (1996) Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 24, 634–642
- 112 Anderson, J.M. *et al.* (1989) ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *J. Cell Biol.* 109, 1047–1056
- 113 Fisher, J.M. *et al.* (1999) Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1143–1150
- 114 Hu, M. *et al.* (1999) Transport and metabolic characterization of Caco-2 cells expressing CYP3A4 and CYP3A4 plus oxidoreductase. *Pharm. Res.* 16, 1352–1359
- 115 Sambuy, Y. *et al.* (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21, 1–26
- 116 Grès, M.C. *et al.* (1998) Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm. Res.* 15, 726–733
- 117 Ranaldi, G. *et al.* (2003) Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. *Toxicol In Vitro* 17, 761–767
- 118 Raeissi, S.D. *et al.* (1997) Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine. *Pharm. Res.* 14, 1019–1025
- 119 Lin, Y.S. *et al.* (2002) Co-Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Contribution to Hepatic and Intestinal Midazolam Metabolism. *Mol Pharmacol* 62, 162–172
- 120 Balimane, P.V. and Chong, S. (2005) Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov. Today* 10, 335–343
- 121 Hewitt, N.J. (2010) Optimisation of the cryopreservation of primary hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* 640, 83–105
- 122 Hewitt, N.J. *et al.* (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab. Rev.* 39, 159–234
- 123 Luttringer, O. *et al.* (2002) Influence of isolation procedure, extracellular matrix and dexamethasone on the regulation of membrane transporters gene expression in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1637–1650
- 124 LeCluyse, E.L. *et al.* (1996) Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22, 133–186

- 125 Nelson, K.F. *et al.* (1982) Long-term maintenance and induction of cytochrome P-450 in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 31, 2211–2214
- 126 Hilgendorf, C. *et al.* (2007) Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1333–1340
- 127 Gerets, H.H.J. *et al.* (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.* 28, 69–87
- 128 Anthérieu, S. *et al.* (2012) Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 26, 1278–1285
- 129 Guillouzo, A. *et al.* (2007) The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 168, 66–73
- 130 Khetani, S.R. and Bhatia, S.N. (2008) Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 26, 120–126
- 131 Khalil, M. *et al.* (2001) Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J. Hepatol.* 34, 68–77
- 132 Palakkan, A.A. *et al.* (2013) Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver Int.* 33, 666–676
- 133 Dimasi, J.A. (2001) Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 297–307
- 134 Clark, D.E. (1999) Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J Pharm Sci* 88, 807–814
- 135 Lin, Z. and Will, Y. (2012) Evaluation of Drugs With Specific Organ Toxicities in Organ-Specific Cell Lines. *Toxicol. Sci.* 126, 114–127
- 136 Robert, J. (1996) [Place of in vitro models in preclinical evaluation of anticancer drugs]. *Bull. Cancer (Paris)* 83, 801–808
- 137 Sung, J.H. *et al.* (2009) Fluorescence optical detection in situ for real-time monitoring of cytochrome P450 enzymatic activity of liver cells in multiple microfluidic devices. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 516–525
- 138 Nahmias, Y. *et al.* (2007) Integration of Technologies for Hepatic Tissue Engineering. In *Tissue Engineering II* (Lee, K. and Kaplan, D., eds), pp. 309–329, Springer Berlin Heidelberg
- 139 Huh, D. *et al.* (2011) From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 21, 745–754
- 140 Kimura, H. *et al.* (2008) An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab Chip* 8, 741–746
- 141 Miret, S. *et al.* (2004) Comparison of in Vitro Models for the Prediction of Compound Absorption across the Human Intestinal Mucosa. *J Biomol Screen* 9, 598–606
- 142 Renken, C.W. 15-Aug-(2013) FILTER DEVICE FOR FACILITATING CHARACTERIZING BEHAVIOR OF CELLS. , 20130210131
- 143 Yu, J. *et al.* (2012) In vitro 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2173–2178
- 144 Ghaemmaghami, A.M. *et al.* (2012) Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discov. Today* 17, 173–181

- 145 Sung, J.H. *et al.* (2011) Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip* 11, 389–392
- 146 Kim, H.J. and Ingber, D.E. (2013) Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr. Biol.* 5, 1130–1140
- 147 Kim, H.J. *et al.* (2012) Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* 12, 2165–2174
- 148 Van Midwoud, P.M. *et al.* (2010) A microfluidic approach for in vitro assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices. *Lab Chip* 10, 2778–2786
- 149 Sin, A. *et al.* (2004) The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol. Prog.* 20, 338–345
- 150 Zhang, C. *et al.* (2009) Towards a human-on-chip: culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab Chip* 9, 3185–3192
- 151 Lin, R.-Z. *et al.* (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3, 1172–1184
- 152 Hamilton, G.A. *et al.* (2001) Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 37, 656–667
- 153 Landry, J. *et al.* (1985) Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 101, 914–923
- 154 Lee, S.-A. *et al.* (2013) Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte-hepatic stellate cell interactions and flow effects. *Lab Chip* 13, 3529–3537
- 155 Nyberg, S.L. *et al.* (2005) Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl.* 11, 901–910
- 156 Meng, Q. (2010) Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6, 733–746
- 157 Tostões, R.M. *et al.* (2012) Human liver cell spheroids in extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. *Hepatology* 55, 1227–1236
- 158 Cai, Z. *et al.* (1989) Development and evaluation of a system of microencapsulation of primary rat hepatocytes. *Hepatology* 10, 855–860
- 159 Falasca, L. *et al.* (2001) Hepatocytes Entrapped in Alginate Gel Beads and Cultured in Bioreactor: Rapid Repolarization and Reconstitution of Adhesion Areas. *Cells Tissues Organs* 168, 126–136
- 160 Ringel, M. *et al.* (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* 206, 153–167
- 161 Guyomard, C. *et al.* (1996) Influence of alginate gel entrapment and cryopreservation on survival and xenobiotic metabolism capacity of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 349–356
- 162 Davis, M.W. and Vacanti, J.P. (1996) Toward development of an implantable tissue engineered liver. *Biomaterials* 17, 365–372
- 163 Swift, B. *et al.* (2010) Sandwich-Cultured Hepatocytes: An In Vitro Model to Evaluate Hepatobiliary Transporter-Based Drug Interactions and Hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 42, 446–471
- 164 Dunn, J.C. *et al.* (1991) Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol. Prog.* 7, 237–245

- 165 Wilson, A.G.E. *et al.* (2011) *New Horizons in Predictive Toxicology: Current Status and Application*, Royal Society of Chemistry.
- 166 LeCluyse, E.L. *et al.* (1994) Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am. J. Physiol.* 266, C1764–1774
- 167 Dunn, J.C. *et al.* (1992) Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J. Cell Biol.* 116, 1043–1053
- 168 Tuschl, G. and Mueller, S.O. (2006) Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes—Cell morphology and differential gene expression. *Toxicology* 218, 205–215
- 169 LeCluyse, E.L. *et al.* (1996) Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22, 133–186
- 170 De Smet, K. *et al.* (2001) Collagen type I gel cultures of adult rat hepatocytes as a screening induction model for cytochrome P450-dependent enzymes. *Altern Lab Anim* 29, 179–192
- 171 Shen, C. and Meng, Q. (2012) Prediction of cytochrome 450 mediated drug-drug interactions by three-dimensional cultured hepatocytes. *Mini Rev Med Chem* 12, 1028–1036
- 172 Canová, N. *et al.* (2004) Evaluation of a flat membrane hepatocyte bioreactor for pharmacotoxicological applications: evidence that inhibition of spontaneously produced nitric oxide improves cell functionality. *Altern Lab Anim* 32, 25–35
- 173 Xia, L. *et al.* (2009) Laminar-flow immediate-overlay hepatocyte sandwich perfusion system for drug hepatotoxicity testing. *Biomaterials* 30, 5927–5936
- 174 Bi, Y.-A. *et al.* (2012) In vitro evaluation of hepatic transporter-mediated clinical drug-drug interactions: hepatocyte model optimization and retrospective investigation. *Drug Metab. Dispos.* 40, 1085–1092
- 175 Weibel, D.B. and Whitesides, G.M. (2006) Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 584–591
- 176 Carraro, A. *et al.* (2008) In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomed Microdevices* 10, 795–805
- 177 Ostrovidov, S. *et al.* (2004) Membrane-based PDMS microbioreactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures. *Biomed Microdevices* 6, 279–287
- 178 Toh, Y.-C. *et al.* (2009) A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. *Lab Chip* 9, 2026–2035
- 179 Van Midwoud, P.M. *et al.* (2010) Microfluidic biochip for the perfusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 184–194
- 180 Baudoin, R. *et al.* (2013) Investigation of expression and activity levels of primary rat hepatocyte detoxication genes under various flow rates and cell densities in microfluidic biochips. *Biotechnol. Prog.* DOI: 10.1002/btpr.1857
- 181 Baudoin, R. *et al.* (2013) Evaluation of seven drug metabolisms and clearances by cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in microfluidic biochips. *Xenobiotica* 43, 140–152
- 182 Prot, J.-M. *et al.* (2011) A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening. *Int J Pharm* 408, 67–75

- 183 Van Midwoud, P.M. *et al.* (2010) Microfluidic biochip for the perfusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 184–194
- 184 Choi, S. *et al.* (2004) Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro* 18, 393–402
- 185 Rossi, C. *et al.* (2012) Co-cultures of enterocytes and hepatocytes for retinoid transport and metabolism. *Toxicol In Vitro* 26, 1256–1264
- 186 Lau, Y.Y. *et al.* (2004) Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metab. Dispos.* 32, 937–942
- 187 Chen, J. and Pang, K.S. (1997) Effect of Flow on First-Pass Metabolism of Drugs: Single Pass Studies on 4-Methylumbelliferone Conjugation in the Serially Perfused Rat Intestine and Liver Preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 24–31
- 188 Sakai, Y. *et al.* (2003) Development of a biohybrid simulator for absorption and biotransformation processes in humans based on in vitro models of small intestine and liver tissues. *J Artif Organs* 6, 273–281
- 189 Ouattara, D.A. *et al.* (2011) Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. *Toxicol. Lett.* 205, 310–319
- 190 Choi, S.H. *et al.* (2004) Enhanced cytochrome P450 capacities of Caco-2 and Hep G2 cells in new coculture system under the static and perfused conditions: evidence for possible organ-to-organ interactions against exogenous stimuli. *Materials Science and Engineering: C* 24, 333–339
- 191 Sung, J.H. *et al.* (2010) A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab Chip* 10, 446–455
- 192 Mahler, G.J. *et al.* (2009) Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 193–205
- 193 PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications - Lab on a Chip (RSC Publishing). *Lab on a Chip* at <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2006/lc/b612140c#!divAbstract>>
- 194 Godoy, P. *et al.* (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87, 1315–1530
- 195 Zhang, D. *et al.* (2012) Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2, 549–561
- 196 Lau, Y.Y. *et al.* (2004) Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metab. Dispos.* 32, 937–942
- 197 Gavhane, Y.N. and Yadav, A.V. (2012) Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharmaceutical Journal* 20, 331–344
- 198 Naudot, M. (2013) *Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces microfluidiques*, Compiègne.
- 199 Choi, S. *et al.* (2004) Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicol In Vitro* 18, 393–402
- 200 Petrulis, J.R. *et al.* (2001) Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environ. Toxicol.* 16, 177–184

- 201 Bois, F.Y. (2009) GNU MCSim: Bayesian statistical inference for SBML-coded systems biology models. *Bioinformatics* 25, 1453–1454
- 202 Hamon, J. *et al.* (2013) Integration of Omics Data and Systems Biology Modeling: Effect of Cyclosporine A on the Nrf2 Pathway in Human Renal Kidneys Cells. *arXiv:1312.4744 [q-bio]* at <<http://arxiv.org/abs/1312.4744>>
- 203 Barter, Z.E. *et al.* (2007) Scaling Factors for the Extrapolation of In Vivo Metabolic Drug Clearance From In Vitro Data: Reaching a Consensus on Values of Human Micro-somal Protein and Hepatocellularity Per Gram of Liver. *Current Drug Metabolism* 8, 33–45
- 204 Zuegge, J. *et al.* (2001) Prediction of hepatic metabolic clearance: comparison and assessment of prediction models. *Clin Pharmacokinet* 40, 553–563
- 205 Pang, K.S. and Rowland, M. (1977) Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the “well-stirred” model over the “parallel tube” model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J Pharmacokinet Biopharm* 5, 655–680
- 206 Pang, K.S. and Rowland, M. (1977) Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a “well-stirred” model and a “parallel tube” model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J Pharmacokinet Biopharm* 5, 625–653
- 207 Ito, K. and Houston, J.B. (2004) Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm. Res.* 21, 785–792
- 208 Prot, J.M. *et al.* (2014) First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol. Bioeng.* DOI: 10.1002/bit.25232
- 209 Lin, J.H. *et al.* (1999) Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol. Rev.* 51, 135–158
- 210 Gertz, M. *et al.* (2010) Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1147–1158
- 211 Paixão, P. *et al.* (2012) Prediction of the human oral bioavailability by using in vitro and in silico drug related parameters in a physiologically based absorption model. *Int J Pharm* 429, 84–98
- 212 Kirkpatrick, C.J. and Mittermayer, C. (1990) Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *J Mater Sci: Mater Med* 1, 9–13
- 213 LeCluyse, E.L. (2001) Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 343–368
- 214 Evans, G.S. *et al.* (1992) The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 101, 219–231
- 215 Moon, C. *et al.* (2014) Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunol* 7, 818–828
- 216 Bricks, T. *et al.* (2014) Comparison of omeprazole and phenacetin hepatic clearances using human primary cryopreserved hepatocytes in petri and microfluidic cultures. *In press*
- 217 Prot, J.M. *et al.* (2014) First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol. Bioeng.* DOI: 10.1002/bit.25232

- 218 Bricks, T. *et al.* (2014) Comparison of omeprazole and phenacetin first pass metabolism using human primary cryopreserved hepatocytes and caco-2 tc7 in microscale bioreactor. *In press*
- 219 Ouattara, D.A. *et al.* (2011) Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. *Toxicology Letters* 205, 310–319
- 220 Mazzei, D. *et al.* (2010) A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 127–137
- 221 Sakai, Y. *et al.* (2004) Use of a perfusion co-culture system consisting of Caco-2 and Hep G2 cell compartments for the kinetic analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Altern Lab Anim* 32 Suppl 1A, 99–103
- 222 Turco, L. *et al.* (2011) Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro* 25, 13–20
- 223 Xu, C. *et al.* (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28, 249–268
- 224 Kaminsky, L.S. and Zhang, Q.-Y. (2003) The Small Intestine as a Xenobiotic-Metabolizing Organ. *Drug Metab Dispos* 31, 1520–1525
- 225 Liu, Y. *et al.* (2014) Hepatocyte cocultures with endothelial cells and fibroblasts on micropatterned fibrous mats to promote liver-specific functions and capillary formation capabilities. *Biomacromolecules* 15, 1044–1054
- 226 Shulman, M. and Nahmias, Y. (2013) Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Methods Mol Biol* 945, 287–302